

VANDKVALITETSINSTITUTTET ATV

Rapport til:

MILJØSTYRELSEN
LOSSEPLADSPROJEKTET
DTH, BYGNING 115
2800 LYNGBY

vedrørende:

ANAEROB NEDBRYDNING AF
CHLOREREDE OPLØSNINGSMIDLER

LOSSEPLADSPROJEKTET

Sekretariat: Lth, Bygning 115, DTH
DK-2800 Lyngby, 02 884200 lokal 5092

MILJØSTYRELSEN
BIBLIOTEKET
Strandgade 29
1401 København K

Sagsbehandler:

civ.ing. Axel Damborg

Sagsnummer:

30.0025

Dato:

1989.02.10 / MK



HOVEDKONTOR

AGERN ALLE 11 TELEFON 02 86 52 11
FORSKNINGSCENTRET TELEFAX 02 86 72 73
DK-2970 HØRSBOLM TELEX 37874 VKICPH
TELEGRAMADRESSE WATERQUALITY
HØRSBOLM

ÅRHUS-AFDELING

FORSKERPARKEN TELEFON 06 20 20 00
GUSTAV WIEDSVEJ 10 06 20 20 11 / 2100
DK-8000 ÅRHUS C TELEFAX 06 20 12 22

LOSSEPLADSPROJEKTET

Sekretariat: LTH, Bygning 115, DTH
DK-2800 Lyngby, 02 884200 lokal 5092

SAMMENFATNING

Chlorerede C_2 -forbindelser er i litteraturen fundet nedbrydelige under aerobe betingelser ved tilstedeværelse af alkaner/aromater, men ellers ikke under aerobe forhold. Dette indikerer en mulig nedbrydning ved co-metabolisme. De chlorerede opløsningsmidler er ikke fundet nedbrydelige under strikt anoxiske forhold. Stofferne er derimod fundet nedbrydelige under anaerobe (methanogene) forhold. Tilsætning af acetat øger nedbrydnings-hastigheden under methanogene forhold.

Dette tyder på, at nedbrydningen er koblet til mikroorganismer, der enten kan oxidere alkaner under aerobe forhold eller kan reducere kuldioxid/methanol/format/acetat til methan under methanogene forhold.

Under aerobe forhold er identificeret en række mikroorganismer, som kan dehalogenere chlorerede methaner (Methylococcus, Hyphomicrobium, Pseudomonas). Egenskaben er knyttet til methanmonooxygenase-dannelse. Denne form for oxidativ dehalogenering er kendt fra leverenzymmer.

Under delvist anaerobe forhold er set en hydrolytisk dechlorering via dehalogenase (halidohydrolase). Egenskaben er f.eks. fundet i Xanthobacter, Pseudomonas, Maraxella, Hyphomicrobium. Dannelsen af dechlorerede C_2 -forbindelser som intermedieære nedbrydningsprodukter under methanogene forhold indikerer en reduktiv dechlorering, som kan være koblet til de enzymesystemer, som reducerer kuldioxid, methanol, format og acetat til methan.

Ved de udførte laboratorieforsøg med tilsætning af acetat som elektronacceptor/primærsubstrat til grundvand fra Skrydstrup specialdepot blev ikke fundet nogen signifikant nedbrydning af 1,1,1-trichlorethan, trichlorethylen eller perchlorethylen i forhold til en fysisk-kemisk kontrol under anaerobe forhold efter 103 dage.

Ved laboratorieforsøgene blev heller ikke fundet nogen signifikant nedbrydning i forhold til den fysisk-kemiske kontrol ved tilsætning rådnese-slam og acetat.

Den manglende nedbrydning i alle forsøgene indikerer, at der i løbet af forsøgsperioden ikke er sket en adaptation af mikroorganismene til de chlorerede opløsningsmidler. Redoxforholdene har i nedbrydningsperioden været strikt anaerobe, idet den tilsatte redoxindikator ikke har vist tegn på øget redoxpotentiale. Temperaturforholdene i de udførte forsøg har været 10 °C, hvilket har kunnet forlænge adaptationsfasen.

De udførte screeningsforsøg med anaerob nedbrydning af chlorerede opløsningsmidler rejser en række spørgsmål vedrørende den anvendte testmetode:

- Den anvendte opstilling af testkolberne er muligvis ikke optimal og der bør i stedet anvendes infusionsflasker opstillet på rysteborde i klimarum.
- Den tilsatte mængde acetat er muligvis ikke tilstrækkelig til at holde biomassen i aktivitet under hele adaptationsfasen. Dette kan undersøges ved samtidige analyser af acetatindholdet i infusionsflaskerne.
- For at sikre tilstedeværelse af anaerobe mikroorganismer kan medtages jordprøver som inoculum i stedet for kun at anvende grundvand.
- Den anvendte redoxindikator's mulige påvirkning af biomassen bør undersøges ved samtidige nedbrydningsforsøg med og uden tilsætning af redoxindikator.
- Fremtidig anvendelse af den anaerobe nedbrydnings-test bør ske med samtidig testning af et referencestof for at afprøve biomassens aktivitet.

SUMMARY

Chlorinated C₂ compounds have been reported degradable in aerobic environments with addition of alkanes/aromatics, but otherwise not. This indicates a possible degradation due to co-metabolism. The chlorinated solvents have not been reported degradable in strictly anoxic environments, but the compounds have been reported degradable in anaerobic (methanogenic) environments. Addition of acetate fasten up the degradation in methanogenic environments.

This indicates that the degradation is connected to microorganisms able to oxidize alkanes in aerobic environments or microorganisms able to reduce carbondioxide/methanol/formate/acetate in methanogenic environments.

In aerobic environments a number of microorganisms able to dehalogenate chlorinated methanes have been identified (Methylococcus, Hyphomicrobium, Pseudomonas). The ability is connected to formation of methane monooxygenase. This type of oxidative dehalogenation is known from liver enzymes.

In partly anaerobic environments a hydrolytic dechlorination due to a dehalogenase (halidohydrolase) has been found. The ability is seen in e.g. Xanthobacter, Pseudomonas, Maraxella, Hyphomicrobium. The formation of dechlorinated C₂ compounds as intermediates in methanogenic environments indicates a reductive dechlorination, which could be connected to the same complex of enzymes, which reduce carbondioxide, methanol, formate and acetate to methane.

In the accomplished laboratory study with addition of acetate as electron acceptor/primary substrate to groundwater from Skrydstrup specialdepot no significant degradation of 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene or

tetrachloroethylene was seen compared to the physico-chemical control in anaerobic environments after 103 days.

In the laboratory study no significant degradation compared to the physico-chemical control was seen with addition of anaerobic sludge and acetate.

The lack of degradation in all the tests indicates, that no adaptation of the microorganisms has occurred. The redox potentials in the tests were strictly anaerobic, as the added redox indicator did not show any sign of increased redox potential. The temperature conditions in the tests were 10 °C, which could have prolonged the adaptation.

The accomplished screening test with anaerobic degradation of chlorinated solvents raise some questions concerning the used test method:

- The arrangement of the test flasks might not have been and in future tests the test flask should be placed on a stirring board.
- The added amount of acetate might not be adequate to feed the biomass during the adaptation. This could be investigated by simultaneous analysis of the concentration of acetate in the test flasks.
- To ensure the presence of anaerobic microorganisms samples of soil could be used as inoculum in stead of using groundwater.
- The effect of the used redox indicator should be examined in simultaneous degradation tests with and without addition of redox indicator.
- In future performances of this test method a reference substance should be used.

I N D H O L D S F O R T E G N E L S E

1.	INDLEDNING	1
2.	LITTERATURVURDERING	3
	2.1. Fysisk-kemiske egenskaber	3
	2.2. Nedbrydelighed	6
	2.2.1. Aerob nedbrydning	8
	2.2.2. Denitrificerende forhold	9
	2.2.3. Methanogene forhold	10
3.	EKSPERIMENTELT ARBEJDE	14
	3.1. Testmetode	14
	3.2. Prøvetagning og forsøgsplan	15
4.	RESULTATER	16
5.	KONKLUSION	23
	5.1. Litteraturstudium	23
	5.2. Laboratorieforsøg	24
6.	REFERENCER	27
	BILAG 1. LITTERATORSØGNING	34
	BILAG 2. NÆRINGSSALTE OG VITAMINER	36

1. INDLEDNING

Dette studium af chlorerede opløsningsmidlers anaerobe nedbrydning er udført som en del af Lossepladsprojektet for Miljøstyrelsen af Vandkvalitetsinstituttet, ATV (VKI).

Formålet med studiet var dels at resumere den viden, der idag er tilgængelig vedrørende anaerob nedbrydning af chlorerede opløsningsmidler via et litteraturstudium, og dels via laboratorieforsøg at undersøge de mest optimale betingelser for anaerob nedbrydning af chlorerede opløsningsmidler i grundvandszonen.

Baggrunden for projektet har været en registrering af et stort antal jord- og grundvandsforureninger med chlorerede opløsningsmidler i Danmark. Forureningerne har væsentligst bestået af tri- og perchlorethylen. Det store antal forureninger har aktualiseret behovet for studier af de chlorerede opløsningsmidlers nedbrydelighed. Resultater fra udenlandske laboratorier viser nedbrydelighed af chlorerede opløsningsmidler under anaerobe forhold /4, 5, 7, 11/. Biologisk nedbrydning i selve jorden/grundvandszonen (in-situ) er en attraktiv afværgeforanstaltning, da omkostningerne ved den biologiske nedbrydning er relativt små sammenlignet med andre afværgeforanstaltninger og da nedbrydningsprodukterne fra den biologiske nedbrydning som regel er ikke-miljøfremmede stoffer.

En anaerob nedbrydning af de chlorerede opløsningsmidler er specielt attraktiv, da denne proces kan anvendes ved en in-situ rensning i grundvandszonen, hvor der kan forventes at være anaerobe forhold. Ved at foretage rensningen in-situ elimineres omkostningerne til opgravning og transport af jord, og de totale omkostninger for rensning af jord og grundvand kan derved reduceres.

Anaerob nedbrydning vil dog kun være attraktiv, såfremt teknikken - anvendt in-situ - reducerer indholdet af

chlorerede opløsningsmidler i tilstrækkeligt grad, og såfremt dette kan ske inden for en tilstrækkelig kort tidshorisont.

Litteraturstudiet har derfor haft til formål at resumere, hvilke ændringer af de fysisk-kemiske forhold i grundvandszonen, der er nødvendige, for at optimere den anaerobe nedbrydning, samt med hvilken hastighed processen kan forløbe og hvilke restprodukter, der kan fremkomme. Litteraturstudiet har desuden dannet baggrund for den eksperimentelle del af projektet.

Laboratorieforsøgene har haft til formål at undersøge nedbrydeligheden og nedbrydningsforløbet under de optimale forhold i en batch screeningstest samt at undersøge anvendeligheden af den anvendte testmetode.

Laboratorietestene er udført med grundvandsprøver fra Lossepladsprojektets pilotlosseplads ved Skrydstrup, hvor der er konstateret høje koncentrationer af bl.a. tri- og perchlorethylen i grundvandet. Grundvandet fra denne lokalitet kan således formodes at indeholde adapterede mikroorganismer, som kan nedbryde de chlorerede opløsningsmidler uden forudgående adaptationsfase. Nedbrydningshastigheden er i laboratorieforsøgene undersøgt i batchtests med tilsætning af acetat som primærsubstrat samt rådnese slam som referenceinoculum.

2. LITTERATURVURDERING

Litteratursøgningen, som er beskrevet i bilag 1, har omfattet dichlorethan (DCA), trichlorethan (TCA), vinylchlorid (VC), dichlorethylen (DCE), trichlorethylen (= trichlorethen) (TCE) og perchlorethylen (= tetrachlorethylen = tetrachlorethen) (PCE).

2.1. Fysisk-kemiske egenskaber

De fysisk-kemiske egenskaber for en række chlorerede C₂-forbindelser er vist i tabel 1. I tabel 1 er desuden vist beregnede/estimerede værdier af Henry's konstant, fordelingskoefficient mellem n-octanol og vand (logP_{OW}) samt adsorptionskonstant for adsorption til organisk stof i jord (K_{OC}).

Henry's konstant (H) er beregnet som forholdet mellem damptryk (i atm.) og opløselighed i vand (i mol/m³) /32/. Henry's konstant multipliceret med gaskonstanten (R = 8,314 J/K·mol) og temperaturen (293,15 K) angiver forholdet mellem stofmængde i luftfase og vandfase. Hvis resultatet af denne udregning er større end 1, betyder det, at stoffet overvejende vil befinde sig i luftfasen og dermed kan stripes fra en vandig opløsning. Det vil sige, at værdier af Henry's konstant større end ca. 10⁻³ angiver, at stofferne vil kunne stripes fra en vandig opløsning.

Fordelingskoefficienten mellem n-octanol og vand (logP_{OW}) er så vidt muligt fremskaffet fra litteraturen og er ellers estimeret ud fra stoffernes struktur. Adsorptionskonstanten for adsorption til organisk stof i jord (K_{OC}) er estimeret ud fra logP_{OW} efter følgende relation /32/:

$$\log K_{OC} = 0,937 \cdot \log P_{OW} - 0,06$$

	1,1-DCA	1,2-DCA	1,1,1-TCA	1,1,2-TCA	
molvægt	98.96	98.96	133.41	133.42	g/mol
smeltepunkt	- 97.4	- 35.4	- 32.5	- 36.7	°C
kogepunkt	57.3	83.5	74.1	113.7	°C
damptryk (0°C)	70	-	-	-	mmHg
(20°C)	180	61	100	19	mmHg
(30°C)	270	105	155	32	mmHg
(40°C)	-	-	-	-	mmHg
opløselighed (20°C)	5500	8690	4400	4500	mg/l
(25°C)	-	-	-	-	mg/l
vægtfylde (20°C)	1.1757	1.2569	1.3376	1.4416	kg/l
Henrys konstant ⁺	$4.26 \cdot 10^{-3}$	$0.91 \cdot 10^{-3}$	$3.99 \cdot 10^{-3}$	$0.74 \cdot 10^{-3}$	atm·m ³ /mol
log P _{ow} ⁺	1.80	1.10	2.50	1.51	
K _{oc} ⁺	50	10	220	25	
CAS-nummer	75-34-3	107-06-2	71-55-6	79-00-5	

	VC	1,1-DCE	cis-1,2-DCE	TCE	PCE	
molvægt	62.50	96.95	96.95	131.40	165.83	g/mol
smeltepunkt	- 153.8	- 122.5	- 81	- 84.8	- 22.7	°C
kogepunkt	- 13.37	31.7	47.2	86.7	121.4	°C
damptryk (0°C)	-	-	-	20	-	mmHg
(20°C)	2530	500	200	60	14	mmHg
(30°C)	-	720	-	95	24	mmHg
(40°C)	-	-	-	-	45	mmHg
opløselighed (20°C)	-	-	800	-	-	mg/l
(25°C)	1100	-	-	1100	150	mg/l
vægtfylde (20°C)	0.9106	1.2129	1.28	1.4649	1.6230	g/cm ³
Henrys konstant ⁺	$189 \cdot 10^{-3}$	$\cdot 10^{-3}$	$31.9 \cdot 10^{-3}$	$9.44 \cdot 10^{-3}$	$20.4 \cdot 10^{-3}$	atm·m ³ /mol
log P _{ow} ⁺	0.92	1.67	1.07	2.29	2.60	
K _{oc} ⁺	7	35	10	140	270	
CAS-nummer	75-01-4	75-35-4	540-59-0	79-01-6	127-18-4	

Tabel 1: Fysisk-kemiske egenskaber for 1,1-dichlorethan (1,1-DCA), 1,2-dichlorethan (1,2-DCA), 1,1,1-trichlorethan (1,1,1-TCA), 1,1,2-trichlorethan (1,1,2-TCA), vinylchlorid (VC), 1,1-dichlorethylen (DCE), cis-1,2-dichlorethylen (cis-1,2-DCE), trichlorethylen (TCE) og perchlorethylen (PCE). ⁺) estimerede værdier.

Den adsorberede mængde stof pr. kg jord ved en given koncentration af stoffet i jordvæsken kan beregnes ud fra Freundlich's isoterm /32/:

$$x/m = K_p \cdot c^{1/n}$$

$$K_p = K_{oc} \cdot \%OC/100$$

hvor x/m er den adsorberede mængde stof (g/kg), C er koncentrationen i jordvæsken (g/l) og $\%OC$ er det procentvise indhold af organisk stof i jorden /32/. Normalt anvendes konstanten $n = 1$ ved beregningerne.

Som det fremgår af tabel 1 forefindes stofferne som væsker i miljøet. Stofferne er moderat opløselige i vand og relativt let fordampelige, men en stripping under naturlige forhold fra grundvandszonen er ikke mulig på grund af den ringe mængde poreluft over den mættede zone. Stofferne adsorberes til det organiske stof i jord, hvorfor en fjernelse via udvaskning og oppumpning af perkolat vil være langvarig. Den naturlige transport fra forureningskilden til grundvandszonen vil tilsvarende være langsom. Tilbageholdelsesfaktoren i sandede jorde med lavt indhold af organisk stof kan være op til 10 gange /33, 42/, hvorved transporthastigheden kun vil være 10% af grundvandets.

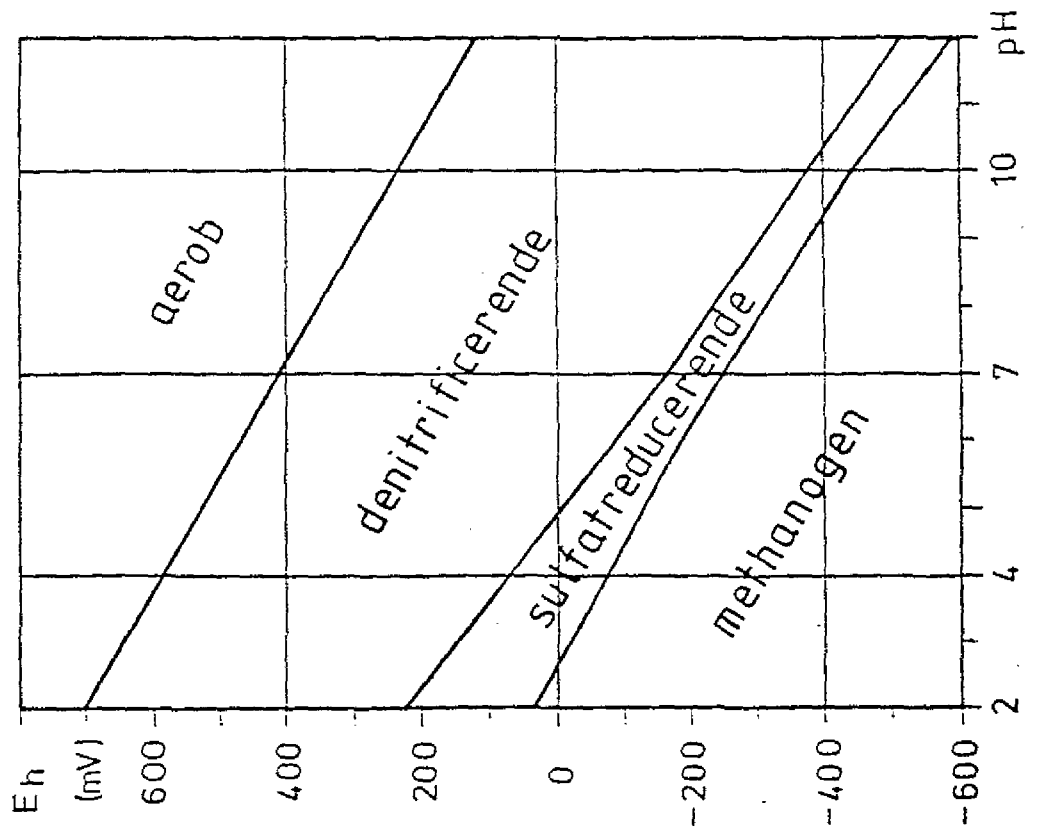
På grund af stoffernes lave opløselighed vil stofferne have en tendens til at bevæge sig i den mættede zone som diskrete dråber i grundvandet. Da vægtfylden af stofferne desuden er større end vands, vil de diskrete dråber søge nedad i den mættede zone og lejres oven på lag med lav permeabilitet som f.eks. lerlag /26/. Den organiske væskefase vil langsomt opløses i grundvandet samtidig med at fasen også transporteres sideløbende med grundvandsstrømmen.

2.2. Nedbrydelighed

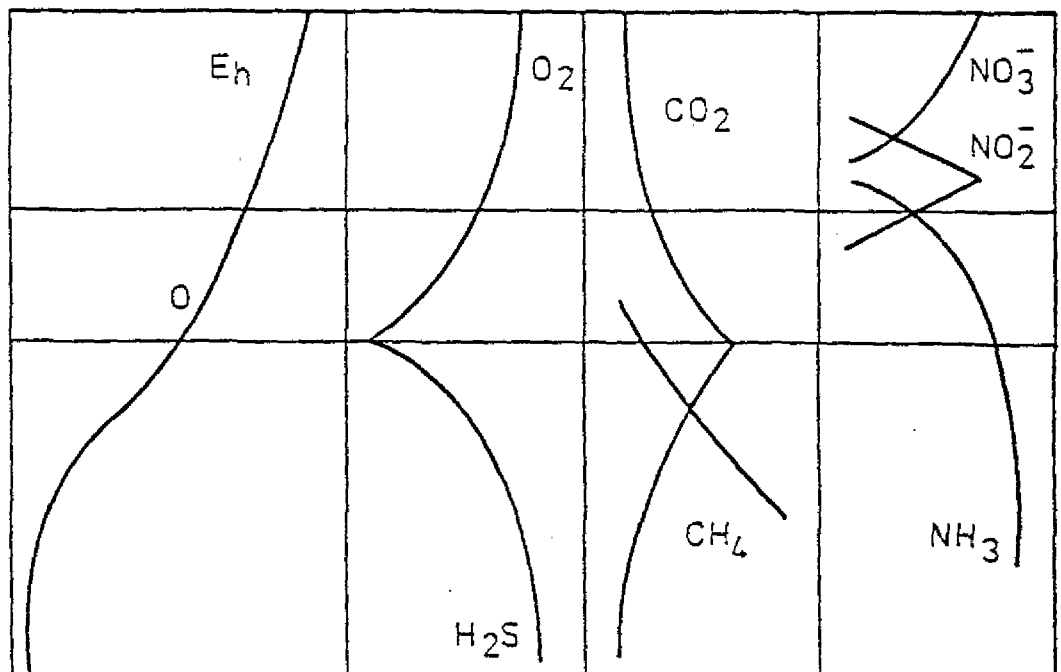
I forbindelse med en vurdering af chlorerede opløsningsmidlers bionedbrydelighed i jord er det hensigtsmæssigt at opdele jorden i en række zoner afhængigt af redoxpotentialer og pH. Ned gennem en jordsøjle vil redoxpotentialet falde, samtidig med at iltkoncentrationen falder. Dette betyder ændrede fysisk-kemiske livsbetingelser for mikroorganismefloraen og dermed forventeligt en ændret sammensætning af floraen.

Ved redoxpotentialer over +400 mV anvendes ilt som elektronacceptor ved nedbrydning af organisk stof (aerobe forhold). I intervallet -100 til +400 mV anvendes nitrat (denitrificerende forhold). I intervallet -300 til -100 mV anvendes sulfat (sulfatreducerende forhold). Ved redoxpotentialer under -300 mV anvendes kuldioxid og organiske stoffer (methanol, eddikesyre m.v.) under dannelse af methan (methanogene forhold).

Normalt betegnes alle forhold med et redoxpotentialer under +400 mV anaerobe (intet forbrug af molekylært ilt). Men en mere fin inddeling af forholdene på baggrund af, hvilke elektronacceptorer, der anvendes, vil være af betydning ved vurdering af nedbrydelighed under anaerobe forhold.



Figur 1: Eksempel på variation i redoxpotentiale (E_h) samt indhold af gasser i en jordsøjle /37/.



Figur 2: Inddeling af livsbetingelser i jord på baggrund af redoxpotentiale (E_h) og pH /47/.

2.2.1. Aerob nedbrydning

Bionedbrydeligheden af trichlorethylen er undersøgt i vandigt medium i en række tests for let og potentiel nedbrydelighed /44/. I den modificerede OECD Screening Test, hvor der anvendes sekundært bundfældet spildevand som inoculum, sås ingen nedbrydning af trichlorethylen inden for 28 dage. I en enkelt test (Closed Bottle Test) er set et iltforbrug svarende til 19% nedbrydning i samme tidsrum. I Zahn-Wellens Test, hvor der anvendes aktivt slam i høje koncentrationer, er ikke set nogen nedbrydning. Den manglende nedbrydning i Zahn-Wellens Test betyder, at trichlorethylen ikke er nedbrydeligt under aerobe forhold, og resultatet af Closed Bottle Testen kan ikke tages som et udtryk for aerob nedbrydelighed, da testresultatet kun er set i en enkelt test.

Forsøg med nedbrydning af 1,1,2-trichlorethan, trichlorethylen og perchlorethylen i havvand viste ingen signifikant nedbrydning inden for 8 dage /25/. Fjernelsen af teststof i testperioden kunne udelukkende tilskrives fordampning fra det åbne testsystem.

Nedbrydeligheden af 1,2-dichlorethan, 1,1,2-trichlorethan, trichlorethylen og perchlorethylen er undersøgt i umættede aerobe kolonner med sandjord /54/. I ingen af kolonnerne sås nedbrydning af de fire teststoffer. Opholdstiden i kolonnen var ca. 2 dage. Ved tilsætning af 0,6% naturgas til poreluften sås efter 2 uger en nedbrydning af trichlorethylen på 95% /60/. Naturgassen bestod væsentligst af metan, ethan og propan.

I forsøg med tilsætning af propan til infiltrationsvæsken i umættede sandkolonner sås 80-90% nedbrydning af trichlorethylen, mens 1,1,1-trichlorethan ikke blev nedbrudt signifikant /59/. Opholdstiden i kolonnen var ca. 5 dage.

Forsøg med en aerob bakteriestamme, isoleret fra spildevand viste ingen nedbrydning af trichlorethylen under aerobe forhold /35/. Tilsætning af phenol, toluen eller o-/m-cresol som primært substrat initierede en fuldstændig nedbrydning af trichlorethylen inden for 24 timer. Dette kunne tyde på, at trichlorethylen kan nedbrydes ved co-metabolisme under aerobe forhold. Co-metabolisme kan også være en forklaring på den nedbrydning, som er set i Closed Bottle Testen, såfremt det anvendte inoculum (recipientvand) i Closed Bottle Testen har indeholdt organiske stoffer, der kunne fungere som primærsubstrat ved en cometabolisk nedbrydning af trichlorethylen.

På baggrund af disse få resultater kan det konkluderes, at de chlorerede opløsningsmidler ikke er nedbrydelige under aerobe forhold. Men ved en tilsætning af små alkaner eller visse aromater, der nedbrydes til alifatiske syrer, kan trichlorethylen nedbrydes; eventuelt ved co-metabolisme. Der er i de gennemførte forsøg ikke analyseret for eventuelle intermediære nedbrydningsprodukter af trichlorethylen. Det antages dog, at trichlorethylen nedbrydes via cis-1,2-dichlorethylen og vinylchlorid til kuldioxid /59, 60/. 1,1,1-trichlorethan er ikke fundet nedbrydeligt under de samme forhold som trichlorethylen.

Tilstedeværelse af bakterier, der kan epoxidere ethylen, kan være en mulig forklaring på nedbrydning af trichlorethylen /22/. Tilsætning af alkaner kan øge mængden af disse bakterier, der som en sideeffekt også epoxiderer trichlorethylen. Epoxidet vil så nedbrydes yderligere. En anden mulighed er tilstedeværelse af methylotrofe bakterier, der er i stand til via et monooxygenase-enzym, at dechlorere halogenerede methaner /60/.

2.2.2. Denitrificerende forhold

1,1,1-trichlorethan, trichlorethylen og perchlorethylen er forsøgt nedbrudt under denitrificerende forhold. Ved

batchforsøg blev tilsat ethanol og nitrat for at skabe denitrificerende forhold, men efter 8 uger var ingen af stofferne nedbrudt /8/.

Ved infiltration af spildevand indeholdende 1,1,1-trichlorethan, trichlorethylen og perchlorethylen i jordkolonner sås heller ingen nedbrydning inden for 2 uger /1, 9/. De denitrificerende forhold blev i dette tilfælde tilvejebragt som følge af spildevandets naturlige indhold af organisk stof og nitrat.

Nedbrydningen af perchlorethylen er også undersøgt i sedimentkolonner under denitrificerende forhold /30/. Her sås heller ingen nedbrydning inden for 17 dage.

Disse forsøg har været forholdsvis kortvarige og kan derfor ikke udelukke en mulig nedbrydning efter en adaptationsfase.

1,2-dichlorethan, 1,1,2-trichlorethan, trichlorethylen og perchlorethylen er søgt nedbrudt i sandet jord fra den mattede zone under forhold, som vurderes at være denitrificerende /56/. Indenfor undersøgelsesperioden på 16 uger sås ingen nedbrydning.

På denne baggrund må det konkluderes, at de chlorerede opløsningsmidler ikke umiddelbart kan nedbrydes under denitrificerende forhold. Hvorvidt en nedbrydning kan finde sted ved tilsætning af kortkædede alkaner vides ikke.

2.2.3. Methanogene forhold

Der foreligger et stort antal undersøgelser af nedbrydeligheden af chlorerede C_1 - og C_2 -forbindelser under methanogene forhold, da nedbrydning under disse forhold har speciel interesse for en in-situ rensning af forurenede jord.

Både trichlorethylen, 1,1-dichlorethylen, cis- og trans-1,2-dichlorethylen er fundet nedbrydelige i jord fra grundvandszonen under methanogene forhold /58/. Nedbrydningen, der forløb uden tilsætning af primær substrat, var langsom med akklimatiseringsperioder op til 16 uger.

Batchforsøg med en methanogen bakteriekultur viste ligeledes nedbrydning af perchlorethylen og trichlorethylen /11/. Også her sås akklimatiseringsperioder på op til 8-12 uger. I kolonneforsøg med en methanogen bakteriekultur, med tilsætning af acetat som primært substrat, sås meget hurtig nedbrydning af perchlorethylen og 1,1,1-trichlorethan efter lag faser på ca. 10 uger /7/. Ved nedbrydningen af perchlorethylen sås dannelse af trichlorethylen.

Dannelsen af trichlorethylen som nedbrydningsprodukt af perchlorethylen er også set i andre kolonneforsøg med en methanogen bakteriekultur og tilsætning af acetat /51/. Her sås samtidig dannelse af dichlorethylen og vinylchlorid samt chlorethan i spormængder. Anvendelse af ^{14}C -mærket perchlorethylen viste dannelse af $^{14}\text{CO}_2$ som tegn på en fuldstændig mineralisering til metan og kuldioxid. Dette tyder på, at methanogene bakterier kan udføre en reduktiv dechlorering af perchlorethylen via trichlorethylen, dichlorethylen og vinylchlorid til metan og kuldioxid. De dannede spormængder af chlorethan tyder på, at vinylchlorid også kan reduceres til chlorethan.

Dannelsen af trichlorethylen ved nedbrydning af perchlorethylen og cis/trans-1,2-dichlorethylen og vinylchlorid ved nedbrydning af trichlorethylen er også påvist i forsøg med sediment tilsat gærekstrakt og pepton som primær substrat /40, 42/. I disse forsøg sås også dannelse af 1,1-dichlorethan ved nedbrydning af 1,1,1-trichlorethan.

Den trinvis nedbrydning kunne ses ved en trinvis dannelse af trichlorethylen, 1,2-dichlorethylen og vinylchlorid.

Nedbrydningsproduktet af trichlorethylen var næsten udelukkende cis-1,2-dichlorethylen.

Den trinvis nedbrydning af perchlorethylen er også observeret i forsøg med sedimentopslemning uden primær substrat /41/.

Nedbrydeligheden af cis/trans-1,2-dichlorethylen samt vinylchlorid er yderligere undersøgt i batchforsøg med methanogene bakteriekulturer isoleret fra sediment /17/. Her sås en hurtig nedbrydning af dichlorethylen og vinylchlorid. Der kunne dog ikke observeres dannelse af vinylchlorid ved nedbrydningen af dichlorethylen.

I forsøg med sediment opslemmet i overfladevand uden ilt med sojamel som primær substrat sås dog dannelse af vinylchlorid ved nedbrydning af både 1,1-dichlorethylen samt cis- og trans-1,2-dichlorethylen /4/. I forsøgene med cis-1,2-dichlorethylen-nedbrydning sås desuden dannelse af chlorethan.

I batchforsøg med nedbrydning af perchlorethylen, trichlorethylen og 1,1,1-trichlorethan under methanogene forhold med aktivt slam som inoculum er også set nedbrydning /19/. Perchlorethylen blev nedbrudt til trichlorethylen i løbet af 3 dage efter en adaptationsfase på 40 dage. Den dannede mængde trichlorethylen blev kun nedbrudt langsomt, og der sås kun små koncentrationer af 1,2-dichlorethylen og vinylchlorid. 1,1,1-Trichlorethan blev nedbrudt til 1,1-dichlorethan uden lag fase, men en yderligere nedbrydning af 1,1-dichlorethan sås ikke.

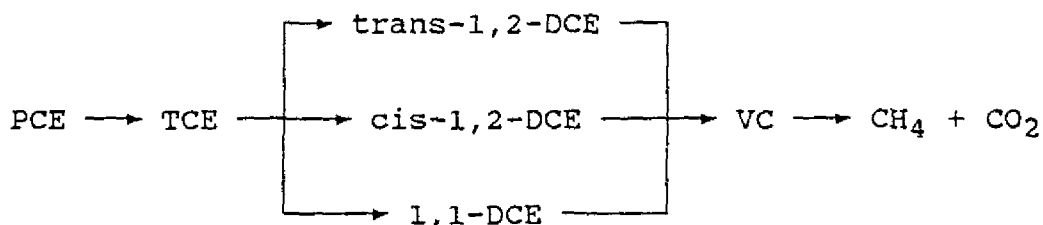
Den reductive dechlorering af perchlorethylen og trichlorethylen er i et enkelt tilfælde også observeret in-situ /60/. Forureningen bestod af punktkilder af perchlorethylen, som var trængt ned i den mættede zone i et sandlag med meget lavt iltindhold (0,1 - 0,7 mg/l). Grundvandet havde et relativt højt indhold af organisk stof

(4-11 mg/l).

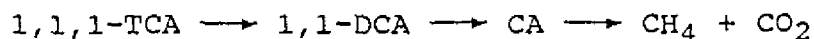
Nedstrøms punktkilderne sås faldende koncentrationer af perchlorethylen, mens koncentrationerne af trichlorethylen, cis-1,2-dichlorethylen og vinylchlorid steg.

Disse observationer viser, at de naturligt forekommende mikroorganismer er i stand til at nedbryde de chlorerede C₂-forbindelser, såfremt de rette forhold er tilstede.

På baggrund af de her refererede undersøgelser med sediment og isolerede methanogene bakteriekulturer må det konkluderes, at chlorerede C₂-forbindelser kan nedbrydes under methanogene forhold. Tilsætning af acetat øger nedbrydningshastigheden. Nedbrydningsvejen er øjensynligt:



og tilsvarende:



I alle de refererede undersøgelser, hvor der blev identificeret dannelse af lavere chlorerede ethaner/ethylen, svarer mængden af dannede nedbrydningsprodukter ikke til den nedbrudte mængde teststof /51/. Dette kan skyldes, at der også dannes andre nedbrydningsprodukter (som f.eks. chlorerede ethanoler), der ikke er identificeret.

Der er altså tale om en trinvis reduktiv dehalogering af både polychloreret ethan og ethylen. Muligheden for en oxidation af dobbeltbindingen i polychloreret ethylen foreligger, idet der i enkelte forsøg med nedbrydning af f.eks. cis-1,2-dichlorethylen er observeret dannelse

af chlorethan /4/. Dette kan ske via en epoxidering af chloreret ethylen /50/ efterfulgt af en reduktion.

3. EKSPERIMENTELT ARBEJDE

Litteraturstudiet viser således, at der er mulighed for en nedbrydning af de chlorerede opløsningsmidler under anaerobe forhold ved tilstedeværelse af et primærsubstrat/elektronacceptor som f.eks. acetat. I forbindelse med undersøgelserne på pilotlossepladsen ved Skrydstrup, hvor forskellige rensningsmetoder afprøves, kan det derfor være formålstjenligt at undersøge, om grundvandet fra dette område indeholder mikroorganismer, der er i stand til at nedbryde de chlorerede opløsningsmidler ved tilsætning af acetat, som det er refereret i litteraturen.

3.1. Testmetode

Til brug ved de indledende batchforsøg, som har til formål at undersøge acetat som primærsubstrat samt at opformere og karakterisere aktive nedbrydere, kræves en relativ enkel og pålidelig (screening) testmetode.

US EPA har udsendt en vejledende testmetode for undersøgelse af anaerob nedbrydning under methanogene forhold /48/. Metoden er en modificeret udgave af en metode til bestemmelse af "biokemisk methan potentiale" og anaerob toksicitet /39/. Metoden anvender primært slam fra anaerobe rensningsanlæg eller anaerobt sediment som inoculum. Inoculum tilsættes testmediet i en koncentration på 10 volumenprocent. I det aktuelle tilfælde anvendes forurennet grundvand som inoculum.

Testmediet består således i testen udelukkende af grundvand tilsat stamopløsninger af næringssalte og vitaminer samt en indikator for kontaminering med ilt (resazurin) (se bilag 2).

Ved forsøgene overføres 100 ml testmedium til infusionsflasker og teststof samt elektronacceptor/primærsubstrat tilsættes.

3.2. Prøvetagning og forsøgsplan

En grundvandsprøve fra Skrydstrup specialdepot er udtaget den 8. februar 1987 fra boring 9 i en dybde af 26,4 m. Temperaturen var ca. 7 °C og redoxpotentiallet målt i felten var ca. + 220 mV. Det høje redoxpotentiale kan enten skyldes en iltning af grundvandet i forbindelse med prøvetagningen, eller at den udtagne grundvandsprøve på forhånd var iltet og dermed må betegnes som anoxisk.

Grundvandsprøven blev transporteret til VKI i nedkølet tilstand (< 10 °C). Ved hjemkomsten blev nitrat- og sulfatindholdet målt til henholdsvis 3,9 mg/l og 40 mg/l. Dette tyder yderligere på, at det udtagne grundvand var anoxisk.

Forsøgene blev gennemført som fire serier:

- I: Fysisk-kemisk kontrol
- II: Teststof
- III: Teststof + natriumacetat
- IV: Teststof + natriumacetat + rådneslam

med tilsætning af et af de tre teststoffer (perchlor-ethylen, trichlorethylen eller 1,1,1-trichlorethan).

Rådneslammet blev udtaget fra Usserød Rensningsanlæg umiddelbart før forsøgenes igangsættelse, og der blev tilsat 1 ml rådneslam pr. 100 ml testmedium i testserie IV.

De fysisk-kemiske kontroller (testserie I) blev tilsat kviksølvchlorid ved en tilsætning af 0,5 ml pr. 100 ml testmedium fra en stamopløsning indeholdende 1 g HgCl₂ pr. 100 ml.

Natriumacetat blev tilsat som primærsubstrat/elektron-acceptor i testserie III og IV ved tilsætning af 1 ml pr. 100 ml testmedium fra en stamopløsning indeholdende 4 g NaCH_3COO pr. l.

Der blev tilsat 0,2 ml af en stamopløsning indeholdende natriumsulfit (S7, se bilag 2) til hver infusionsflaske for at nedbringe redoxpotentiallet.

Til hver infusionsflaske blev tilsat et af følgende teststoffer ved hjælp af Hamilton-sprøjte:

- A: Perchlorethylen
- B: Trichlorethylen
- C: 1,1,1-Trichlorethan

Til infusionsflasker med perchlorethylen er tilsat 2,0 μl pr. 100 ml svarende til en koncentration på 32,5 mg/l. Til infusionsflasker med trichlorethylen er tilsat 2,2 μl pr. 100 ml svarende til en koncentration på 32,2 mg/l. Til infusionsflasker med 1,1,1-trichlorethan er tilsat 2,4 μl pr. 100 ml svarende til en koncentration på 32,1 mg/l.

Testopløsningerne blev inkuberet i vandbad i mørke ved 10°C.

Nedbrydningen blev fulgt ved kemiske analyser af restindholdet af chlorerede opløsningsmidler i væskefasen.

4. RESULTATER

Resultaterne af nedbrydningstesten, som forløb over en periode på 103 dage er vist i tabel 2 - 4. En eventuel nedbrydning af det tilsatte teststof, som i testgruppe A var perchlorethylen (PCE), i testgruppe B trichlorethylen (TCE) og i testgruppe C 1,1,1-trichlorethan (TCA) kan ses som et fald i koncentrationen af disse stoffer

i forhold til koncentrationen i den fysisk-kemiske kontrol mærket testserie I. En nedbrydning vil desuden ifølge litteraturen føre til dannelse af nedbrydningsprodukterne trichlorethylen og trichlorethan i testgruppe A og trichlorethan i testgruppe B.

Koncentrationsforløbet for den fysisk-kemiske kontrol (testserie I) og de øvrige prøver (testserie II, III og IV) er for hvert af teststofferne vist i figur 3 - 5.

PCE	TID	Fys/kem	PCE	PCE+NaAc	PCE+NaAc+slam
	0	280	270	270	350
	18	73	110	290	180
	32	86	85	160	140
	47	130	140	67	86
	61	87	75	81	130
	103	65	83	170	230
TCE	TID	Fys/kem	PCE	PCE+NaAc	PCE+NaAc+slam
	0	2	0	0	0
	18	1	0	0	0
	32	0	0	0	0
	47	0	0	0	0
	61	0	0	0	0
	103	0	0	0	0
TCA	TID	Fys/kem	PCE	PCE+NaAc	PCE+NaAc+slam
	0	12	12	12	12
	18	4	3	4	3
	32	9	8	3	6
	47	0	0	0	0
	61	0	0	0	0
	103	0	0	0	0

Tabel 2: Koncentrationer af perchlorethylen, trichlorethylen og 1,1,1-trichlorethan i testgruppe A med tilsat perchlorethylen. Koncentrationerne er angivet i [$\mu\text{g}/\text{l}$]. Tidsforløbet er angivet i [dage].

Som det fremgår af tabellerne har grundvandsprøverne haft et mindre baggrundsindhold af alle tre teststoffer (perchlorethylen: $26,1 \pm 23,9 \mu\text{g/l}$; trichlorethylen: $9,5 \pm 9,7 \mu\text{g/l}$; trichlorethan: $12,3 \pm 0,7 \mu\text{g/l}$). Indholdet varierer for trichlorethylen og perchlorethylen mellem serierne A, B og C, men variationen indenfor serierne er meget lille. Dette kan skyldes en forskellig håndtering af grundvandsprøverne ved opstilling af de tre serier, og dermed kan være fordampet forskellige mængder af tri- og perchlorethylen.

PCE	TID	Fys/kem	TCE	TCE+NaAc	TCE+NaAc+slam
	0	53	43	50	47
	18	13	14	14	14
	32	17	13	15	17
	47	9	9	10	10
	61	15	10	13	12
	103	7	10	10	12
TCE	TID	Fys/kem	TCE	TCE+NaAc	TCE+NaAc+slam
	0	1300	1200	1200	1100
	18	300	330	340	350
	32	320	290	320	420
	47	420	460	410	440
	61	540	440	510	490
	103	400	450	450	460
TCA	TID	Fys/kem	TCE	TCE+NaAc	TCE+NaAc+slam
	0	12	14	12	12
	18	4	4	4	5
	32	3	3	3	6
	47	0	0	0	0
	61	0	0	0	0
	103	0	0	0	0

Tabel 3: Koncentrationer af perchlorethylen, trichlorethylen og 1,1,1-trichlorethan i testgruppe B med tilsat trichlorethylen. Koncentrationerne er angivet i [$\mu\text{g/l}$]. Tidsforløbet er angivet i [dage].

Det fremgår desuden af tabellerne og figurerne, at koncentrationerne af alle tre teststoffer falder væsentligt i alle tre testgrupper i løbet af de første 18 dage mellem opstart og første prøvetagning. Koncentrationerne målt ved opstart er også mindre end de koncentrationer, som er beregnet ud fra den tilsatte mængde. Dette fald skyldes antageligt fordampning fra væskefasen til den ovenstående luft i infusionsflaskerne. Efter første prøvetagning er faldet meget lille.

PCE	TID	Fys/kem	TCA	TCA+NaAc	TCA+NaAc+slam
	0	3	3	3	7
	18	1	1	1	2
	32	1	0	1	2
	47	1	1	0	1
	61	1	1	1	1
	103	1	1	1	1
TCE	TID	Fys/kem	TCA	TCA+NaAc	TCA+NaAc+slam
	0	17	19	17	21
	18	6	5	5	6
	32	8	7	7	9
	47	7	10	8	12
	61	8	4	6	10
	103	6	5	6	7
TCA	TID	Fys/kem	TCA	TCA+NaAc	TCA+NaAc+slam
	0	400	430	410	570
	18	120	140	130	150
	32	170	160	150	200
	47	120	230	170	270
	61	200	180	150	270
	103	170	150	150	160

Tabel 4: Koncentrationer af perchlorethylen, trichlorethylen og 1,1,1-trichlorethan i testgruppe C med tilsat 1,1,1-trichlorethan. Koncentrationerne er angivet i [$\mu\text{g/l}$]. Tidsforløbet er angivet i [dage].

Det fremgår desuden, at forskellen mellem de fysisk-kemiske kontroller og de øvrige testkolber er meget lille. Dette betyder, at der i forsøgsperioden ikke er sket nogen signifikant biologisk nedbrydning af de chlorerede opløsningsmidler.

I testserie IV, hvor der er tilsat anaerobt slam, der ifølge litteraturen kan adapteres til de chlorerede opløsningsmidler, ses heller ingen signifikante fald i forhold til de fysisk-kemiske kontroller.

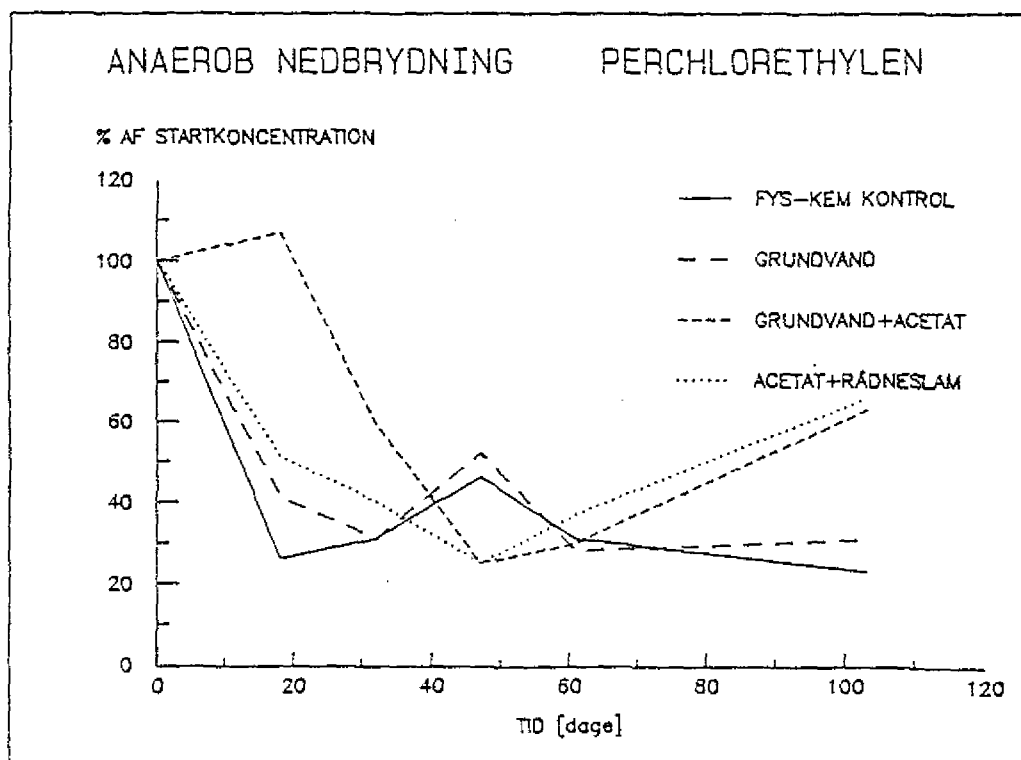
Dette indikerer, at mikroorganismene i det anaerobe slam i løbet af testperioden på 103 dage (ca. 15 uger) ikke er blevet adapteret. Dette kan skyldes, at adaptationsfasen er længere end 103 dage, men i litteraturen er adaptationsfasen for laboratorieforsøg fundet at være mindre. Den næstsidste måling er foretaget efter 61 dage (ca. 9 uger), og konklusionen om manglende adaptation bygger således kun på det sidste målepunkt. Der er dog ikke set adaptation i nogen af de tre testgrupper.

Tilsvarende er der ikke fundet nogen signifikant nedbrydning i de forsøg, der udelukkende anvendte grundvand tilsat natriumacetat (testserie II). Dette betyder, at det udtagne grundvand ikke har indeholdt mikroorganismer, der på forhånd var adapteret til de anvendte chlorerede opløsningsmidler, eller at grundvandet ikke har indeholdt mikroorganismer, der kunne adapteres til de chlorerede opløsningsmidler.

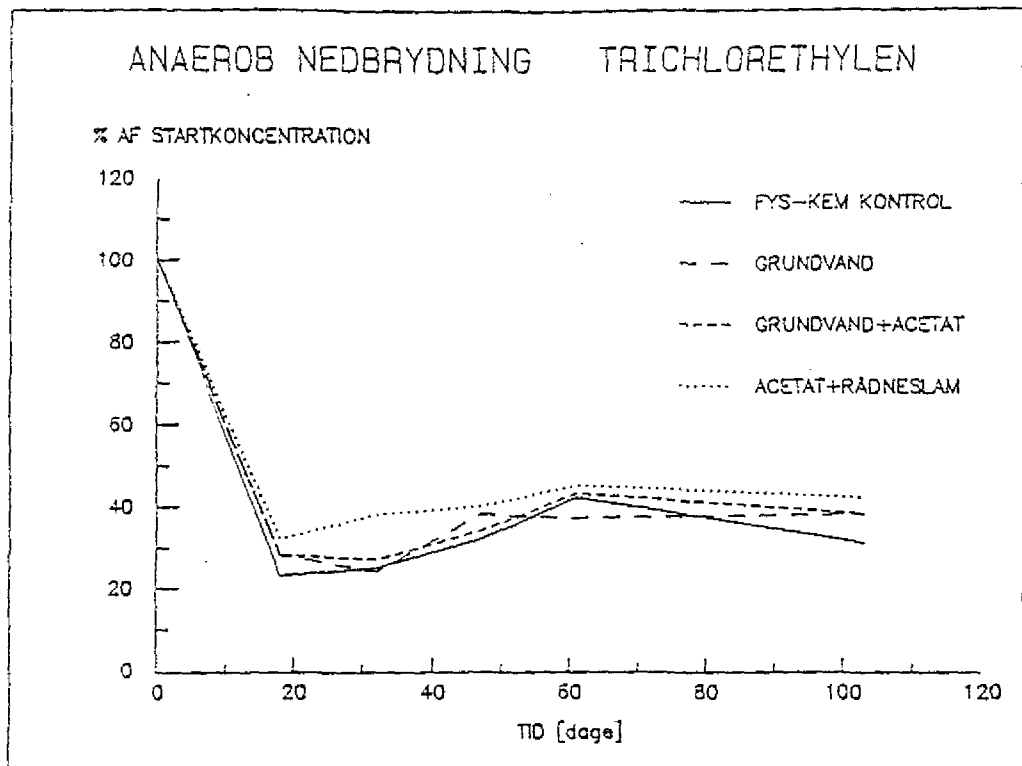
Målingerne af redoxpotentialer samt nitrat- og sulfatindhold indikerer, at det udtagne grundvand ikke har været anaerobt men derimod anoxisk. Til trods for at grundvandsprøven er udtaget i stor dybde, er der mulighed for at der er sket en væsentlig tilstrømning af vand fra de ovenliggende områder i jordsystemet, idet boringen var filtersat i hele boringens dybde. Dette betyder, at indholdet af anaerobe mikroorganismer, der kunne være

ansvarlige for en eventuel nedbrydning, kun har været til stede i lille mængde.

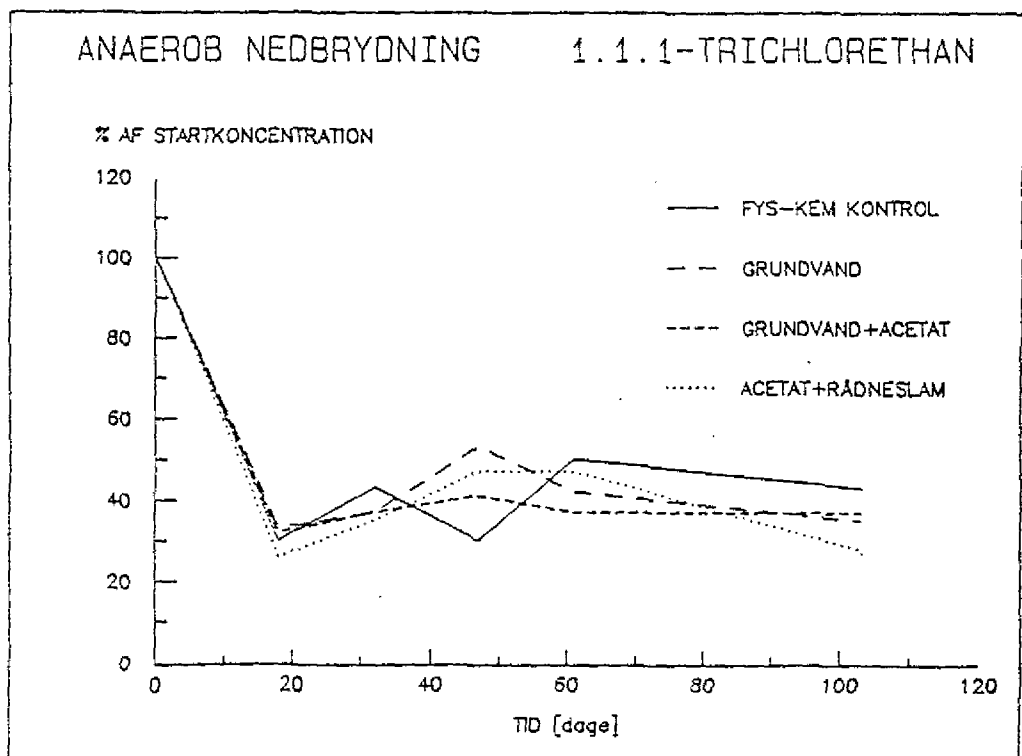
Da der heller ikke blev fundet nedbrydning ved tilsætning af anaerobt slam, kan det dog ikke udelukkes, at de anaerobe mikroorganismer blot ikke er blevet adapteret til nedbrydningen i løbet af forsøgsperioden.



Figur 3: Koncentrationsforløb af perchlorethylene gennem forsøgsperioden i procent af startkoncentration.



Figur 4: Koncentrationsforløb af trichlorethylen gennem forsøgsperioden i procent af startkoncentration.



Figur 5: Koncentrationsforløb af 1,1,1-trichlorethan gennem forsøgsperioden i procent af startkoncentration.

5. KONKLUSION

5.1. Litteraturstudium

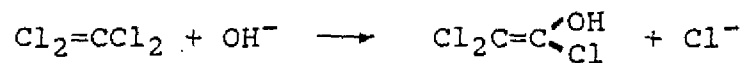
De chlorerede C₂-forbindelser er i litteraturen fundet nedbrydelige under aerobe betingelser ved tilstedeværelse af alkaner/aromater, men ikke under strikt aerobe eller forhold. Dette kan betyde, at de chlorerede opløsningsmidler kan nedbrydes aerobt ved co-metabolisme. De chlorerede opløsningsmidler er ikke fundet nedbrydelige under strikt anoxiske forhold. Stofferne er derimod fundet nedbrydelige under anaerobe (methanogene) forhold. Tilsætning af acetat øger nedbrydningshastigheden under methanogene forhold. Dette tyder på, at nedbrydningen er koblet til mikroorganismer, der enten kan oxidere alkaner under aerobe forhold eller kan reducere kuldioxid/methanol/format/acetat til methan under methanogene forhold.

Under aerobe forhold er identificeret en række mikroorganismer, som kan dehalogenere chlorerede methaner (Methylococcus, Hyphomicrobium, Pseudomonas). Egenskaben er knyttet til methanmonooxygenase-dannelse /14/. I Hyphomicrobium arter er det aktive enzym blevet induceret af dichlorethan, men dichlorethan blev ikke nedbrudt /28, 29/. Muligheden for at nedbrydningen af chlorerede C₂-forbindelser under aerobe forhold er knyttet til et alkan-oxygenase system foreligger dog /50/. Denne form for oxidativ dehalogenering er kendt fra lever enzymer /50/.

Under delvist anaerobe forhold er set en hydrolytisk dechlorering via dehalogenase (halidohydrolase) /26/. Egenskaben er f.eks. fundet i Xanthobacter, Pseudomonas, Maraxella, Hyphomicrobium /21, 26/. Nedbrydningsproduktet er en alkohol. Et sådant hydrolase enzym, isoleret fra Xanthobacter kunne dechlorere 1,1-dichlorethan, men ikke de tilsvarende ethylenere /26/. Denne proces regnes dog som en sandsynlig nedbrydningsvej også for ethylenere /50/.

Fra jord er isoleret en fakultativ methylotrof mikroorganisme, der er i stand til at anvende 1,2-dichlorethylen som eneste kulstofkilde /24,59/. Organismen indeholder ingen oxidase-systemer. Ved nedbrydningen af 1,2-dichlorethylen dannes 2-chlorethanol, der metaboliseres videre til 2-chloracetat og ethylenglycol. I samme undersøgelse er desuden isoleret en Pseudomonas art, der kan omsætte 2-chlorethanol som eneste kulstofkilde.

Dannelsen af dechlorerede C₂-forbindelser som intermediære nedbrydningsprodukter under methanogene forhold indikerer dog en anden, reduktiv mekanisme. Den reduktive dechlorering kan være koblet til de enzymsystemer, som reducerer kuldioxid, methanol, format og acetat til methan. Reaktionen kan eventuelt ske via dannelse af en alkohol som nævnt ovenfor:



Normalt antages dog kun kuldioxid, methanol, format og acetat at kunne anvendes som substrat for denne proces.

5.2. Laboratorieforsøg

Ved de udførte laboratorieforsøg med og uden tilsætning af acetat som elektronacceptor/primærsubstrat til grundvand fra Skrydstrup specialdepot blev ikke fundet nogen signifikant nedbrydning af 1,1,1-trichlorethan, trichlorethylen eller perchlorethylen i forhold til en fysisk-kemisk kontrol under anaerobe forhold. Forsøgsperioden var 103 dage.

Ved laboratorieforsøgene blev heller ikke fundet nogen signifikant nedbrydning i forhold til den fysisk-kemiske

kontrol ved tilsætning rådneslam og acetat.

Ved alle forsøgene sås i starten af forsøgene en fordampning af teststofferne til den ovenstående luftfase i de lukkede infusionsflasker. Denne fordampning fandt sted i løbet af de første 18 dage mellem forsøgenes start og den første prøvetagning. Derefter sås intet fald i den vandopløste koncentration af teststofferne.

Den manglende nedbrydning i alle forsøgene indikerer, at der i løbet af forsøgsperioden ikke er sket en adaptation af mikroorganismene til de chlorerede opløsningsmidler. Redoxforholdene har i nedbrydningsperioden været strikt anaerobe, idet den tilsatte redoxindikator ikke har vist tegn på øget redoxpotentiale.

Ud fra litteraturstudiet skulle det forventes, at der ville ske en adaptation og efterfølgende nedbrydning i de forsøg, hvor der blev tilsat rådneslam og acetat.

Temperaturforholdene i de udførte forsøg er dog så lave som 10 °C, hvilket har kunnet forlænge adaptationsfasen. Den udeblevne adaptation kan også skyldes, at adaptationsperioden er blevet forlænget på grund af manglende omrystning af infusionsflaskerne under forsøget, hvilket har mindsket opblandingen mellem teststof og de anaerobe mikroorganismer. En anden mulighed er, at den tilsatte mængde acetat blev forbrugt af mikroorganismene, inden der skete en adaptation til de chlorerede opløsningsmidler.

De udførte målinger af redoxpotentiale samt nitrat- og sulfatkoncentration indikerer, at det udtagne grundvand overvejende var anoxisk. Det er derfor muligt for at den udtagne grundvandsprøve ikke har indeholdt adapterede anaerobe mikroorganismer. Dette kan dog ikke forklare, at der ikke er set adaptation i de testserier, hvor der er tilsat rådneslam.

De udførte screeningsforsøg med anaerob nedbrydning af chlorerede opløsningsmidler rejser derfor en række spørgsmål vedrørende den anvendte testmetode:

- 1) Den anvendte opstilling af teskolberne er muligvis ikke optimal og der bør i stedet anvendes infusionsflasker opstillet på rysteborde i klimarum.
- 2) Den tilsatte mængde acetat er muligvis ikke tilstrækkelig til at holde biomassen i aktivitet under hele adaptationsfasen og den efterfølgende nedbrydningsfase. Dette kan undersøges ved samtidige analyser af acetatindholdet i infusionsflaskerne. Analyserne kan samtidig tages som et mål for den mikrobielle aktivitet i nedbrydningsmediet. Eventuelt kan der tilsættes acetat flere gange under nedbrydningsforløbet ved injektion af en stamopløsning.
- 3) For at sikre tilstedeværelse af anaerobe mikroorganismer kan medtages jordprøver som inoculum i stedet for kun at anvende grundvand. Dette giver dog en inhomogenitet mellem de forskellige batch i hver testserie.
- 4) Den anvendte redoxindikator's mulige påvirkning af biomassen bør undersøges ved samtidige nedbrydningsforsøg med og uden tilsætning af redoxindikator.
- 5) Fremtidig anvendelse af den anaerobe nedbrydnings-test bør ske med samtidig testning af et referencestof for at afprøve biomassens aktivitet. Der er ikke i den amerikanske forskrift, der ligger til grund for den anvendte metode, nævnt eksempler på referencestoffer.

6. REFERENCER

- /1/ Baarschers, W.H., Bharath, A.I., Elvish, J. & Davies, M.:
The biodegradation by Klebsiella pneumonia.
Can.J.Microbiol. 28(1982):176-179.
- /2/ Balkwill, D.L. & Ghiorse, W.C.:
In-situ characterization of microorganisms indigenous
to water-table aquifers.
PB85-101731 EPA/600/D-84/232, 1984.
- /3/ Barrio-Lage, G.A., Parsons, F.Z. & Nassar, R.S.:
Kinetics of the depletion of trichloroethene.
Environ.Sci.Technol. 21(1987):366-370.
- /4/ Barrio-Lage, G., Parsons, F.Z., Nassar, R.S. & Lorenzo,
P.A.:
Sequential dehalogenation of chlorinated ethenes.
Environ.Sci.Technol. 20(1986):96-99.
- /5/ Barrio-Lage, G.A., Parsons, F.Z., Nassar, R.S. & Lorenzo,
P.A.:
Biotransformation of trichloroethene in a variety of
subsurface materials.
Environ.Toxicol.Chem. 6(1987):571-578.
- /6/ Bealy, N. & Daniels, L.:
Production of ethane, ethylene, and acetylene from halo-
genated hydrocarbons by methanogenic bacteria.
Appl.Environ.Microbiol. 53(1987):1604-1610.
- /7/ Bouwer, E.J. & McCarty, P.L.:
Transformation of 1- and 2-carbon halogenated aliphatic
organic compounds under methanogenic conditions.
Appl.Environ.Microbiol. 45(1983):1286-1294.
- /8/ Bouwer, E.J. & McCarty, P.L.:
Transformation of halogenated organic compounds under
denitrification conditions.
Appl.Environ.Microbiol. 45(1983):1295-1299.
- /9/ Bouwer, E.J., McCarty, P.L., Bouwer, H. & Rice, R.C.:
Organic contaminant behavior during rapid infiltration
of secondary wastewater at the Phoenix 23rd Avenue pro-
ject.
Water Res. 18(1984):463-472.
- /10/ Bouwer, E.J., McCarty, P.L. & Lance, J.C.:
Trace organic behavior in soil columns during rapid in-
filtration of secondary wastewater.
Water Res. 15(1981):151-159.

- /11/ Bouwer, E.J., Rittmann, B.E. & McCarty, P.L.:
Anaerobic degradation of halogenated 1- and 2-carbon
organic compounds.
Environ.Sci.Technol. 15(1981):596-599.
- /12/ Bruckner, F. & Kugele, H.:
Saneirung von mit leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasser-
stoffen (CKW) kontaminierten Böden mittels Absaugung der
Bodenluft.
Korrespondenz Abwasser 32(1981):863-866.
- /13/ Cohen, Y. & Ryan, P.A.:
Multimedia modeling of environmental transport: Trichloro-
ethylene test case.
Environ.Sci.Technol. 19(1985):412-417.
- /14/ Colby, J. & Dalton, H.:
Some properties of a soluble methane mono-oxygenase from
Methylococcus capsulatus strain bath.
J.Biochem. 157(1976):495-497.
- /15/ Dijkhuizen, L. & Harder, W.:
Regulation of autotrophic and heterotrophic metabolism
in Pseudomonas oxalaticus OX1: Growth on mixtures of
acetate and formate in continuous culture.
Arch.Microbiol. 123(1979):47-53.
- /16/ Fogel, S., Lancione, R.L. & Sewall, A.E.:
Enhanced biodegradation of methoxychlor in soil under
sequential environmental conditions.
Appl.Environ.Microbiol. 44(1982):111-120.
- /17/ Fogel, M.M., Taddeo, A.R. & Fogel, S.:
Biodegradation of chlorinated ethenes by a methaneuti-
lizing mixed culture.
Appl.Environ.Microbiol. 51(1986):720-724.
- /18/ Folkard, G.K.:
The significance, occurrence and removal of volatile chlo-
rinated hydrocarbon solvents in groundwaters.
Water Pollut.Control 85(1986):63-70.
- /19/ Gossett, J.M.:
Anaerobic degradation of C1 and C2 chlorinated hydro-
carbons.
Air Force Eng.Serv.Cent., Tech.Rep. ESL-TR-85-38, 1985.
- /20/ Haider, K.:
Degradation of chlorinated aliphatic and aromatic com-
pounds by aerobic and anaerobic soil microorganisms.
Comm. Eur. Communities, EUR 6388, Environ. Res. Programme,
p.200-204, 1980.
- /21/ Hardman, D.J. & Slater, J.H.:
Dehalogenases in soil bacteria.
J.Gen.Microbiol. 123(1981):117-128.

- /22/ Hou, C.T., Patel, R., Laskin, A.J., Barnabe, N. & Barist, I.:
Epoxidation of short-chain alkenes by resting-cell suspensions of propane-grown bacteria.
Appl.Environ.Microbiol. 46(1983):171-177.
- /23/ Janssen, D.B., Scheper, A., Dijkhuizen, L. & Witholt, B.:
Degradation of halogenated aliphatic compounds by Xanthobacter autotrophicus GJ10.
Appl.Environ.Microbiol. 49(1985):673-677.
- /24/ Janssen, D.B., Scheper, A. & Witholt, B.:
Biodegradation of 2-chlorophenol and 1,2-dichloroethane by pure bacterial cultures.
Prog.Ind.Microbiol. 20(1984):169-178.
- /25/ Jensen, S. & Rosenberg, R.:
Degradability of some chlorinated aliphatic hydrocarbons in sea water and sterilized water.
Water Res. 9(1975):659-661.
- /26/ Keuning, S., Janssen, D.B. & Witholt, B.:
Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from Xanthobacter autotrophicus GJ10.
J.Bacteriol. 163(1985):635-639.
- /27/ Kleopfer, R.D., Easley, D.M., Haas, B.B., Deihl, T.G., Jackson, D.E. & Wurrey, C.J.:
Anaerobic degradation of trichloroethylene in soil.
Environ.Sci.Technol. 19(1985):277-279.
- /28/ Kohler-Staub, D., Hartmans, S., Galli, R., Suter, F. & Leisinger, T.:
Evidence for identical dichloromethane dehalogenases in different methylotrophic bacteria.
J.Gen.Microbiol. 112(1986):2837-2844.
- /29/ Kohler-Staub, D & Leisinger, T.:
Dichloromethane dehalogenase of Hyphomicrobium sp. strain DM2.
J.Bacteriol. 162(1985):676-681.
- /30/ Kuhn, E.P., Colberg, P.J., Schnoor, J.L., Wanner, O., Zehnder, A.J. & Schwarzenbach, R.P.:
Microbial transformation of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: Laboratory column studies.
Environ.Sci.Technol. 19(1985):961-968.

- /31/ Loch, J.P.G., Kool, H.J., Lagas, P. & Verheul, J.H.A.M.:
Removal and retention of volatile hydrocarbons in the
soils' unsaturated zone.
i J.W.Assink & W.J.van den Brink (Eds): Contaminated
soil.
Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holland, 1986.
- /32/ Lyman, W.J., Reehl, W.F. & Rosenblatt, D.H.:
Handbook of chemical property estimation methods.
McGraw-Hill, New York, 1982.
- /33/ Mackay, D.M., Roberts, P.V. & Cherry, J.A.:
Transport of organic contaminants in groundwater.
Environ.Sci.Technol. 19(1985):384-392.
- /34/ Milde, G., Nerger, M. & Mergler, R.:
Biological degradation of volatile chlorinated hydro-
carbons in groundwater.
i International Symposium on Groundwater Microbiology,
Kuopio, Finland, 4.-6. august, 1987.
- /35/ Nelson, M.J.K., Montgomery, S.O., Mahaffey, W.R. & Prit-
chard, P.H.:
Biodegradation of trichloroethylene and involvement of
an aromatic biodegradative pathway.
Appl.Environ.Microbiol. 53(1987):949-954.
- /36/ Nichols, P.D., Henson, J.M., Antworth, C.P., Parsons,
J., Wilson, J.T. & White, D.C.:
Detection of a microbial consortium, including type II
methanotrophs, by use of phospholipid fatty acids in an
aerobic halogenated hydrocarbon-degrading soil column
enriched with natural gas.
Environ.Toxicol.Chem. 6(1987):89-97.
- /37/ Odum, E.P.:
Fundamentals of ecology, 3rd ed.
Saunders, Philadelphia, 1971.
- /38/ Ollis, D.F.:
Contaminant degradation in water. Heterogenous photo-
catalysis degrades halogenated hydrocarbon contaminants.
Environ.Sci.Technol. 19(1985):480-484.
- /39/ Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy, J.B., Young, L.Y. &
McCarty, P.L.:
Bioassay for monitoring biochemical methane potential
and anaerobic toxicity.
Water Res. 11(1979):485-492.
- /40/ Parsons, F. & Barrio-Lage, G.:
Chlorinated organics in simulated groundwater environ-
ments.
J.Am.Water Works Assoc. 77(1985):52-59.

- /41/ Parsons, F., Barrio-Lage, G. & Rice, R.:
Biotransformation of chlorinated organic solvents in
static microcosms.
Environ.Tox.Chem. 4(1985):739-742.
- /42/ Parsons, F., Wood, P.R. & DeMarco, J.:
Transformation of tetrachloroethene and trichloroethene
in microcosms and groundwater.
J.Am.Water Works Soc. 76(1984):56-59.
- /43/ Petura, J.C.:
Trichloroethylene and methyl chloroform in groundwater:
A problem assessment.
J.Am.Water Works Assoc. 73(1981):200-205.
- /44/ Rott, B., Wiswanathan, R., Freitag, D. & Korte, F.:
Vergleichende Untersuchung der Anwendbarkeit verschiedener
Tests zur Überprüfung der Abbaubarkeit von Umweltkemi-
kaliën.
Chemosphere 11(1982):531-538.
- /45/ Shelton, D.R. & Tiedje, J.M.:
General method for determining anaerobic biodegradation
potential.
Appl.Environ.Microbiol. 47(1984):850-857.
- /46/ Smith, G.A., Nickels, J.S., Davis, J.D., Findlay, R.M.,
Vashio, P.S., Wilson, J.T. & White, D.G.:
Indices identifying subsurface microbial communities
that are adapted to organic pollution.
PB85-177780 EPA/600/D, 1985.
- /47/ Stumm, W. & Morgan, J.J.:
Aquatic chemistry, 3rd ed.
John Wiley & Sons, New York, 1981.
- /48/ US EPA, CS-2050:
Anaerobic Biodegradation.
US EPA, Washington, august 1982.
- /49/ Verschueren, K.:
Handbook of environmental data on organic chemicals,
2nd ed.
Van Nostrand Reinhold, New York, 1983.
- /50/ Vogel, T.M., Criddle, C.S. & McCarty, P.L.:
Transformation of halogenated aliphatic compounds.
Environ.Sci.Technol. 21(1987):722-736.
- /51/ Vogel, T.M. & McCarty, P.L.:
Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloro-
ethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon
dioxide under methanogenic conditions.
Appl.Environ.Microbiol. 49(1985):1080-1083.

- /52/ Vogel, T.M. & McCarty, P.L.:
Rate of abiotic formation of 1,1-dichloroethylene from
1,1,1-trichloroethane in groundwater.
J.Contam.Hydrol. 1(1987):299-308.
- /53/ Wilson, J.T., Cosby, R.L. & Smith, G.B.:
Potential for biodegradation of organo chlorine compounds
in groundwater.
PB84-194612 EPA/600/D-84/118, 1984.
- /54/ Wilson, J.T., Enfield, C.G., Dunlap, W.J., Cosby, R.L.,
Foster, D.A. & Baskin, L.B.:
Transport and fate of selected organic pollutants in a
sandy soil.
J.Environ.Qual. 10(1981):501-506.
- /55/ Wilson, J.T. & McNabb, J.F.:
Biological transformation of organic pollutants in ground-
water.
EOS Transactions 64(1983):504-507
- /56/ Wilson, J.T., McNabb, J.F., Balkwill, D.L. & Ghiorse, W.C.:
Enumeration and characterization of bacteria indigenous
to a shallow water-table aquifer.
Ground Water 21(1983):134-142.
- /57/ Wilson, J.T., McNabb, J.F., Wilson, B.H. & Noonan, M.J.:
Biotransformation of selected organic pollutants in ground-
water.
Dev.Ind.Microbiol. 24(1983):224-233.
- /58/ Wilson, B.H., Smith, G.B. & Rees, J.F.:
Biotransformation of selected alkylbenzenes and haloge-
nated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer
material: A microcosm study.
Environ.Sci.Technol. 20(1986):997-1002.
- /59/ Wilson, B.H. & White, M.V.:
A fixed-film bioreactor to treat trichloroethyleneladen
waters from interdiction wells.
Sixth National Symposium and Exposition on Aquifer Resto-
ration, Columbus, Ohio, May 19-22, 1986.
- /60/ Wilson, J.T. & Wilson, B.H.:
Biotransformation of trichloroethylene in soil.
Appl.Environ.Microbiol. 49(1985):242-243.
- /61/ Windholz, M. (Ed.):
The Merck Index, 10th ed.
Merck & Co., Rahway, New Jersey, 1983.

- /62/ Yokota, T., Fuse, H., Omori, T. & Minoda, Y.:
Microbial dehalogenation of haloalkanes mediated by oxygenase or halohydrolyase.
Agric.Biol.Chem. 50(1986):453-460.
- /63/ Zehnder, A.J., Huser, B.A., Brock, T.D. & Wuhrmann, K.:
Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium.
Arch.Microbiol. 124(1980):1-11.

BILAG 1

LITTERATURSØGNING

Det gennemførte litteraturstudium har været baseret på følgende:

- gennemgang af tilgængelig håndbogslitteratur.
- litteratursøgning på Dialog databaser via VKI's on-line system.

Ved on-line litteratursøgningen er søgt i følgende databaser:

- Chemical Abstract
- Biosis
- Enviroline
- Water Ressources Abstracts
- Pollution Abstracts
- Aqualine.

Der er søgt i perioden 1978-1987. Som overordnede descriptorer ved søgningen har været anvendt:

- stofnavne
- CAS-registreringsnumre.

Som underordnede descriptorer har været anvendt:

- anaerob ? (F) degradat ?
- anaerob ? (F) biodegradat ?
- anaerob ? (F) deteriorat ?
- anoxic (F) degradat ?
- anoxic (F) biodegradat ?
- anoxic (F) deteriorat ?
- dechlor ?
- dehalogen ?

hvor "?" angiver, at ordets endelse ikke er fastlagt og "(F)" at de to ord forekommer umiddelbart efter hinanden.

Mindre tilgængelige sprog (russisk, polsk, japansk, kinesisk o.lign.) er udelukket fra søgningen.

BILAG 2

NÆRINGSSALTE OG VITAMINER

Næringssalte og vitaminer:

<u>S1:</u>	27,2	g	KH_2PO_4	
				i 1 l deioniseret vand
<u>S2:</u>	35,6	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	
				i 1 l deioniseret vand
<u>S3:</u>	24,0	g	NH_4Cl	
	24,0	g	NaCl	
	8,8	g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	
	8,0	g	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	
<u>S4:</u>	8,0	g	NaHCO_3	
				i 1 l deioniseret vand
<u>S5:</u>	2,0	g	$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	
	0,38	g	H_3BO_3	
	0,14	g	ZnCl_2	
	0,18	g	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	
	0,1	g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	
	0,17	g	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	
	2	g	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	
	0,5	g	EDTA	
	1	ml	1,0 M HCl	
				i 1 l deioniseret vand
<u>S6:</u>	2	mg	biotin	
	2	mg	folinsyre	
	10	mg	pyridoxin hydrochlorid (B_6)	
	5	mg	riboflavin (B_2)	
	5	mg	thiamin (B_1)	
	5	mg	B_{12}	
	5	mg	p-aminobenzosyre	
	5	mg	Nicotinsyre	
				i 1 l deioniseret vand
<u>S7:</u>	1,75	g	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	
				i 10 ml deioniseret vand
<u>S8:</u>	0,5	g	Resazurin	
				i 1 l deioniseret vand
<u>S9:</u>	85	g	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	
	14	g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	
				i 1 l deioniseret vand

Testmediet er fremstillet på følgende måde:

1,6 l forurennet grundvand overføres til en 5 l kolbe og gennemblæses med N_2 (1 [l/min]). Dernæst tilsættes:

50	ml	S1
50	ml	S2
40	ml	S3
2,5	ml	S8

Der tilsættes deioniseret vand til et volumen på 2,9 l, og gennembløsningen med N₂ fortsættes i minimum 15 minutter. Dernæst tilsættes:

160	ml	S4
3,2	ml	S5
25	ml	S6
3,2	ml	S9

Gennembløsningen ændres til 30% CO₂ og 70% N₂ ved 1 l/min og fortsættes indtil pH stabiliseres på 7,1. Derefter fyldes op til 3,2 l med grundvand. Mediet fordeles i tre flasker, der forsegles. Mediet fremstilles umiddelbart før opstart af ny nedbrydningstest for at sikre optimal aktivitet af biomassen i mediet.