



Miljø- og
Fødevareministeriet
Miljøstyrelsen

Pilotprojekt - In situ test af stimuleret aerob nedbrydning til oprensning af pesticidpunktkilder

Miljøprojekt nr. 1964
Oktober 2017



Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Katerina Tsitonaki, Orbicon A/S

Sandra Roost, Orbicon A/S

Lars C. Larsen, Orbicon A/S

Kresten Andersen, Orbicon A/S

Anders Johansen, Aarhus Universitet

Ulrich Bay Gosewinkel, Aarhus Universitet

Tue K. Nielsen, Aarhus Universitet

ISBN: 978-87-93614-32-1

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse

Indhold

Forord	4
Sammenfatning	5
Summary	10
1. Indledning	15
1.1 Projektets formål	17
1.2 Rapportens struktur	17
2. Beskrivelse af lokaliteten	18
2.1 Baggrund	18
2.2 Geologi og hydrogeologi	19
2.3 Forureningssituationen	23
2.4 Spredningsveje og revideret konceptuel model	24
3. Udførelse af pilotforsøg	26
3.1 Etablering af testfelterne	26
3.2 Monitoringsprogram	38
4. Resultater fra pilotforsøget	41
4.1 Geologi og hydrogeologi	41
4.2 Iltspredning og redoxforhold	42
4.3 Pesticidkoncentrationer	45
4.4 Mikrobielle parametre	48
5. Opsamling af erfaringer og konklusion	54
6. Perspektivering	57
7. Referencer	59
Bilag A Litteraturgennemgang af metoder til injektion af ilt	
Bilag B Oversigt over mikrobiologiske analyser og resultater på Skelstofte	
Bilag C Situationsplaner	
Bilag D Analysedata samlet	
Bilag E Figurer i stort format	
Bilag F Økonomioverslag ved opskalering	

Forord

Miljøstyrelsen har under Miljøstyrelsens Teknologiprogram for jord- og grundvandsforurening igangsat dette projekt for at belyse, hvorvidt stimulering af biologisk nedbrydning ved tilførsel af ilt og bakterier kan anvendes til oprensning af visse typer af pesticidpunktkilder. Projektet er et pilotforsøg i to afgrænsede områder, hvorefter metoden vil blive vurderet i forhold til en opskalering mhp. fuld oprensning af kildeområdet.

Region Sjælland er bygherre og medfinansierende for projektet, som endvidere er finansieret under Miljøstyrelsen Teknologiuudviklingspulje. Projektet udføres med Orbicon som bygherreprådgiver. Det skal bemærkes, at offentliggørelse af projektet ikke nødvendigvis betyder, at indholdet giver udtryk for Miljøstyrelsens eller Region Sjællands synspunkter.

I projektets indledende fase er der udført et litteraturstudium af nationale og internationale erfaringer med afværge-løsninger med tilsætning af ilt. Formålet er at opnå det bedst mulige vidensgrundlag, som vil kunne tages med i detailprojekteringen af det planlagte pilotforsøg. Der er sket en udvikling i projektets indhold undervejs i forløbet. Ved igangsætning af mere detaljerede undersøgelser i kildeområdet forud for detailprojekteringen var målet at lokalisere et hotspot i moræneleren. Pilotforsøget skulle herefter være udført på både det højpermeable sandlag og det lavpermeable morænelerlag. Det er imidlertid ikke lykket at lokalisere et hotspot i moræneleren, hvilket har bevirket, at pilot-forsøget udelukkende blev gennemført i det øvre sandlag.

Pilotforsøget er udført i perioden fra september 2014 til maj 2015. Forsøget er udført af Orbicon i samarbejde med Region Sjælland og Aarhus Universitet.

Sammenfatning

Baggrund

Det vurderes, at en væsentlig del af pesticidforureningen af det danske grundvand stammer fra punktkildeforureninger. Ved en pesticidpunktkilde forstås en forureningskilde, som kan opstå, hvor der har været håndtering, opbevaring, spild og/eller bortledning mv. af pesticider. Punktkilderne er karakteriseret ved høje koncentrationer med pesticider på små arealer. Dette er i modsætning til fladekilder, hvor der konstateres lavere koncentrationer på større arealer som følge af bl.a. den landbrugsmæssige spredning af pesticider. På grund af den trussel, som pesticidpunktkilder vurderes at kunne udgøre over for grundvandet, er det således attraktivt at udvikle oprensningmetoder til at fjerne disse koncentrerede forureninger for at forhindre udsivning til grundvandet i årevis fremover.

Studier har vist, at specifikke bakteriekulturer er i stand til at vokse på phenoxysyrer, når pesticiderne er til stede i en vis mængde, som det f.eks. er tilfældet med punktkilder. Det er denne proces, som laboratorieforsøg har vist kan stimuleres ved tilsætning af ilt. Endvidere er der potentiale for at øge nedbrydningshastigheden ved at tilsætte bakterier, der kan nedbryde phenoxysyrerne. Stimuleret nedbrydning af en punktkildeforurening med phenoxysyrer ved tilsætning af ilt er derimod, så vidt vides, endnu ikke afprøvet i felten. Men det er blevet grundigt undersøgt under laboratorieforhold med sediment og grundvand fra to danske lokaliteter, hvor det blev det påvist, at tilsætning af ilt kan stimulere den biologiske nedbrydning af phenoxysyrer i jord og grundvand fra to forskellige lokaliteter.

Formål

Formålet med projektet var at udføre et pilotforsøg i felten, hvor det undersøges, hvorvidt aerob nedbrydning af phenoxysyre-pesticider kan stimuleres ved tilsætning af ilt suppleret med tilsætning af specifikke pesticidnedbrydende bakterier. Forsøget er udført på en forurennet lokalitet, Skelstoft, hvor der er konstateret en forurening med phenoxysyrer-pesticider, som er vurderet til at kunne udgøre en grundvandsrisiko. Strategien for pilotforsøget var at forsøge at tilføre ilt til den højerpermeable zone i det øvre sandlag i det område, hvor der var konstateret de højeste forureningsniveauer med phenoxysyrer (især dichlorprop og 4-PPP). Der er forud for pilotforsøget gennemført en opsamling på erfaringer mv. i forhold til at opnå tilgængelige erfaringer med metoder til ilttilførsel som afværgemetode som supplement til gennemførelse af pilotforsøget.

Pilotforsøget har, i det omfang det var muligt, skulle belyse følgende problematikker:

- Kan aerob nedbrydning af phenoxysyre-pesticider stimuleres ved tilførsel af ilt alene?
- Kan redoxforholdene i et magasin ændres ved tilsætning af ilt i en periode, der er tilstrækkelig til at stimulere nedbrydningen?
- Har bioaugmentering med specifikke bakterier en betydelig effekt i forhold til nedbrydningshastighed, eller er stimulering med ilt tilstrækkelig?
- Hvilke praktiske udfordringer er der i forbindelse med håndtering og injektion af bakterier – herunder opformering, transport og opbevaring

Projektet har omfattet følgende faser:

1. Litteraturstudie med en opsamling på erfaringer mv. i forhold til at opnå tilgængelige erfaringer med metoder til ilttilførsel som afværgemetode (vedlagt i Bilag A).
2. Detailprojektering af pilotforsøg
3. Feltarbejde (udførelse af pilotforsøg) og monitorering
4. Databehandling, dokumentation og afrapportering

Metode

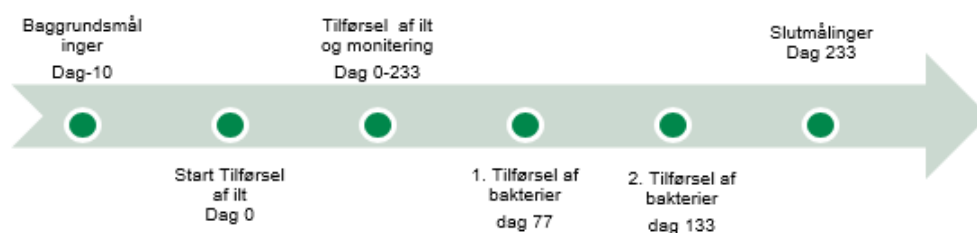
Pilotforsøget blev gennemført i to testfelter, som blev etableret i nærheden af det formodede hotspotsområde.

I testfelt 1 blev der udelukkende tilført ilt, mens der i testfelt 2 blev tilført ilt og efterfølgende bakterier. Tilførslen af bakterier i testfelt 2 skulle belyse, hvorvidt tilførsel af bakterier vil give en mærkbar forøget nedbrydning i forhold til det første testfelt, hvor de naturligt forekommende bakterier formodentlig er adapteret til at kunne nedbryde phenoxysyrer pga. den årelange tilvænning hertil. I begge pilotforsøgsfelter blev der målt for indhold af phenoxysyrer, ilt og mikrobielle parametre før hver aktivitet som vist på nedenstående diagrammer

Testfelt 1: Kun iltning



Testfelt 2: Iltning og bioaugmentering, tidsforløb parallelt til ren iltning



Overordnet forureningssituationen og geologi

På lokaliteten er der konstateret en kraftig forurening med phenoxysyre-pesticider samt mindre indhold af andre pesticider som BAM, hexazinon osv. Det har ikke været muligt at lokalisere hotspottet af forureningen trods omfattende undersøgelser. Dog ses der i det øvre sandmagasin et indhold af phenoxysyrer-pesticider på over 100 µg/l. I forbindelse med pilotforsøget er der udført en omfattende monitorering, der viser store variationer i indholdet af phenoxysyrer-pesticider i den samme boring samt i meget nærliggende borer med en indbyrdes afstand på mindre end 2 meter. Der er i forbindelse med etablering af testfelter yderligere udført 15 nye borer på lokaliteten. Boringerne skal dels anvendes som injektionsboringer og som monitoringsboringer i testfelterne.

Lokaliteten ligger i, et for lollandske forhold, ret kraftig kuperet terræn, og i et område med en meget kompleks geologi og hydrogeologi. Den lokale geologi viser, at der under de postglaciale lag, der ud over tørv og gytje også består af ler og silt, træffes moræneler (øvre moræne). Under den øvre moræne ses et sandlag med lokal udbredelse (terrænnært sand), som dog ikke er udbredt i hele kildeområdet. I de øvrige områder hviler det øvre moræne direkte på mellem moræne. Under det terrænnære sand/øvre moræne findes et lag af moræneler, der igen underlejres af det øvre sandmagasin. Det er dette øvre sandmagasin, som er i fokus i forhold til pilotforsøget.

Resultater fra pilotforsøget

Tilførsel af iltning

Tilførsel af ilt til sandmagasinet er udført ved brug af diffusere. Selve styring af ilttilførsel er foregået ukompliceret. Installationen af diffusere har ligeledes været nem, og det har været muligt at tilføre de ønskede mængde ilt til magasinet. Spredning af ilt har været meget forskellige i de to testfelter. I testfelt 1 har iltkoncentrationen været lavt, trods en øget tilførsel. Til gengæld er der i testfelt 2 en god spredning af ilt over hele testfeltet

Tilførsel af bakterier

Tilførsel af bakterier er udført ved at tilføre inokulum bestående af *Sphingomonas herbicidovorans* MH i filtersatte borer og derefter opblende det i grundvandet ved recirkulering. Metoden var nem at udføre i praksis, men efterfølgende dokumentation viste, at bakterierne ikke var i stand til at sprede sig nedstrøms på den pågældende lokalitet. Ved fremtidig forsøg skal der overvejes alternative metoder til bioaugmentering, der sikrer en større spredning af bakterierne, eksempelvis ved direct-push eller injektion i flere borer. Senere resultater har vist en større koncentration af bakterie i boring B2, hvilket kan tyde på, at recirkulering har virket mod hensigten og ikke ført til en homogen bakteriespredning mellem de to injektionsboringer.

Mikrobielle målinger i løbet af forsøget viste, at de tilsatte bakterier *Sphingomonas herbicidovorans* MH ikke blev transporteret i jorden (uanset dybde) – i hvert fald ikke i et omfang, der kunne distribuere dem til den nærmeste monitoreringsboring, der ligger ca. en halv meter fra de borer, hvor bakterierne blev tilført. Ud fra resultaterne i dette feltstudie, ser det ud til at *Sphingomonas herbicidovorans* MH har sådanne egenskaber og er i stand til at overleve i længere perioder (måneder). Ligeledes var de metabolisk intakte mht. nedbrydning af dichlorprop.

Vurdering af nedbrydning af phenoxy-syre-pesticider og mekanismerne bagved

Resultaterne viser, at der i næsten alle monitoringsboringer er sket et fald i koncentrationen af dichlorprop i forbindelse med, at forholdene er blevet aerobe og der er tilsat bakterier. Ved pilotforsøgets afslutning er koncentrationerne af dichlorprop i begge testfelter under detektionsgrænsen.

Dog kan et fald i koncentrationen ikke alene ses som bevis på nedbrydning, hvorfor der også er udført en række mikrobielle analyser for at styrke bevisgrundlaget for nedbrydning med flere "lines of evidence". På trods af, at der på lokaliteten er udført en omfattende monitoring af pesticidkoncentrationerne, er det svært at uddrage konklusioner om, hvorvidt der forekommer nedbrydning på baggrund af det. Tolkning af resultater kompliceres af flere faktorer:

- Der er en naturlig variation i koncentrationerne af phenoxysyrer-pesticiderne i kildeområdet. De højeste baggrundkoncentrationer af dichlorprop ses i de nedre filtre, hvor iltspredning har været mindre.
- Startkoncentrationen af dichlorprop i de øvre filtre har generelt været meget lav. Samtidigt er det netop disse filtre, hvor iltkoncentrationen er steget mest. Der ses et forsvindende indhold af dichlorprop i disse filtre, men den meget lave startkoncentration gør det svært at uddrage entydig konklusionen om årsagen.
- Der ses i nogle filtre, at indholdet af dichlorprop stiger kraftigt efter ilttilførsel. Dette kan skyldes enten variationer i strømningsmønstre på lokaliteten eller at tilførsel af ilt øger frigivelse af dichlorprop fra organisk materiale eller immobile lommer.

De mikrobielle analyser har vist følgende:

- Inden injektion af bakterier ses der en lav bakterietæthed og et meget homogen miljø med lav bakterielle diversitet. En lav diversitet (taksonomisk såvel som funktionel) vil sandsynligvis have en negativ konsekvens for den naturlige mikrobiotas evne til at nedbryde miljøfremmede stoffer såsom pesticider.
- Mineraliseringsforsøg inden injektion viste, at jorden i kildeområdet ikke indeholder naturligt forekommende mikroorganismer, der kan nedbryde dichlorprop under tilstedeværelse af ilt. Derfor er det usandsynligt, at tilførsel af ilt i testfelt 1 har forårsaget en sådan stimulering af den naturlige biota, at faldet i koncentrationen af dichlorprop skyldes nedbrydning.
- Mineraliseringsforsøg efter injektion af bakterier (baseret på udtagne vandprøver fra testfelt 2) viste ligeledes, at der ikke er mikroorganismer blandt den naturlige mikrobiota, der er i stand til at nedbryde dichlorprop. Derfor er det usandsynligt, at tilførsel af ilt og bakterier i testfelt 2 har forårsaget sådan en stimulering af den naturlige biota, at faldet i koncentrationen af dichlorprop i monitoringsboringerne skyldes nedbrydning.
- Mineraliseringsforsøg med vandprøver fra borer, hvor der var detekteret *Sphingomonas* (dvs. fra bakterieinjektionsboringerne) viste et stort nedbrydningspotentiale. Det forventes derfor, at der i disse borer i testfelt 2 foregår biologisk nedbrydning af dichlorprop. En mulig forklaring på de faldende dichlorprop koncentrationer i nedstrøms borerne i testfelt 2 kunne være, at de er påvirket af tilstrømmende grundvand, som er strømmet igennem den bioaktive zone mellem B1 og B2.

Resultaterne af målinger på lokaliteten viser, som tidligere nævnt, at der forekommer et kraftigt fald i koncentrationen af dichlorprop ved iltning. Det er ikke muligt at konkludere om denne skyldes nedbrydning eller andre processer, da data fra mineraliseringsforsøgene ikke udviser nedbrydningspotentiale i monitoringsbrønde – kun i de brønde hvor nedbryderbakterien blev filført. En mulig forklaring på den manglende nedbrydningspotentiale ved mineraliseringsforsøg kan være, at de naturligt forekommende bakterier ikke kan nedbryde dichlorprop til ende (mineralisering), hvilket vil betyde et fald i moderforbindelsen, som det observeret her.

I flere borer ses et kraftigt fald i koncentrationen af dichlorprop samtidigt med, at der observeres iltgennembrud, men uden, at der ses nedbrydning i mineraliseringsforsøg fra samme borer. Dette indikerer at faldet i koncentrationen af dichlorprop ikke skyldes processer omkring boringen, men tilstrømning af vand, der har passeret den bioaktive zone der er skabt mellem injektionsboringerne.

Pilotforsøget illustrerer nødvendigheden for flere "lines of evidence" når det kommer til dokumentation af nedbrydning i feltet.

Perspektivering- Vurdering af opskalermuligheder

På grund af kompleksiteten af de hydrogeologiske og forureningsmæssige forhold på Skelstoft har det været svært at uddrage entydige konklusioner fra pilotforsøget. Det kan muligvis

give bedre resultater ved at udføre forsøget i større testfelter, således at prøvetagning og ilt/bakterier har en mindre påvirkning på porevandets volumen. I forhold til en fremtidig opskalering af teknologien til in situ oprensning er der gjort følgende erfaringer:

- Tilsætning af ilt er en billig og nem proces. Det er tilstrækkeligt at tilføre ilt i bunden af magasinet, da opdrift vil sikre den vertikale fordeling af ilten.
- Tilsætning af bakterier igennem borer er ligeledes en nem metode. Dog blev bakterierne ikke transporteret så meget med grundvandet som forventet i pilotforsøget. Ved større projekter, skal alternative metoder anvendes. Disse kunne være tilsætning af bakterier med direct-push eller en anden type af trykinjektion, for at sikre en bedre fordeling inden for feltet. Det er muligt, at der ved tilsætning af ilt og bakterier i et transekt, som i testfelt 2, kan etableres en bioaktiv zone, hvor det tilstrømmende vand behandles. Det er billigt og nemt at holde zonen aerob i længere tid, så længe ilttilførslen fortsætter. Dog kan denne metode ikke ses som en kildeoprensning, men nærmere en længerevarende faneoprensning i lighed med afværgepumpning. Et overslag over omkostninger viser at metoden kan blive mere omkostningseffektiv i forhold til afværgepumpning, primært på grund af de lavere driftsomkostninger.
- Mobilisering af metaller som resultat af sedimentoxidation i grundvandsmagasiner kan forekomme. I sandmagasiner vurderes det, at evt. mobilisering vil være begrænset. Dog kan der i kalkmagasiner forekomme en betydelig spredning af især arsen, grundet de lave Kd-værdier og høje strømningshastigheder i sprækker. Denne risiko skal tages i betragtning ved valg af afværge tæt på indvindingsboringer.

Summary

Background

A significant part of the pesticide contamination in Danish groundwater is thought to result from point sources. A pesticide point source is here defined as a confined contaminated site in which there has been handling, storage, spillage and / or disposal etc. of pesticides. Point sources are characterized by high concentrations of pesticides in small areas. This is in contrast to diffuse sources where lower concentrations are found on larger areas due to, the agricultural use of pesticides on farmland. Due to the threat posed by pesticide point sources to groundwater, it is attractive to develop remediation method to deal with pesticide point sources.

Studies have shown that specific bacterial cultures are able to grow on phenoxy-acid pesticides. According to laboratory tests this process can be further stimulated by the addition of oxygen. Furthermore, there is potential for increasing the rate of degradation by adding bacteria that can break down the phenoxy-acid pesticides. Stimulated degradation of a point source contamination with phenoxy-acid pesticides by the addition of oxygen is, to the best of knowledge, not yet tested in the field. However, detailed lab experiments with sediments and groundwater from two Danish sites showed that the addition of oxygen stimulated the biodegradation of phenoxy-acid pesticides in soil and groundwater at both sites.

Aim

The aim of the project was to conduct a pilot field test to investigate whether aerobic degradation of phenoxy-acid pesticides can be stimulated by the addition of oxygen supplemented with the addition of specific pesticide degrading bacteria. The experiment has been carried out at a contaminated site, Skelstofte, where contamination with phenoxy-acid pesticides poses a groundwater threat. The pilot field test strategy consisted of adding oxygen in the high-permeable zone of the upper sand layer, in the area where the highest levels of contamination (especially dichlorprop and 4-PPP) were found. Prior to the pilot test, we conducted a literature study on oxygen supply methods for remediation purposes.

The pilot field tests aimed at answering the following questions

- Can we stimulate aerobic degradation of phenoxy acid pesticides by the sole addition of oxygen?
- Can redox ratios in a magazine be changed by adding oxygen for a period sufficient to stimulate degradation?
- Does bioaugmentation with specific bacteria have a significant effect in relation to degradation rate or is oxygen stimulation sufficient?
- What practical challenges are involved in handling and injecting bacteria - including cultivation of a sufficient amount, transport and storage?

The project included the following phases:

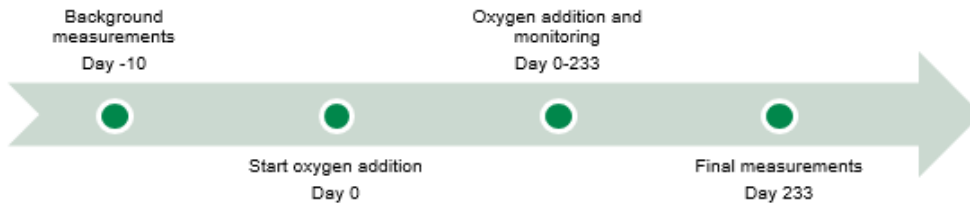
1. Literature study with a collection of experiences, in relation to oxygen supply methods for remediation purposes (enclosed in Appendix A).
2. Detail design of pilot field tests
3. Field work (execution of pilot field tests) and monitoring
4. Data processing, documentation and reporting

Method

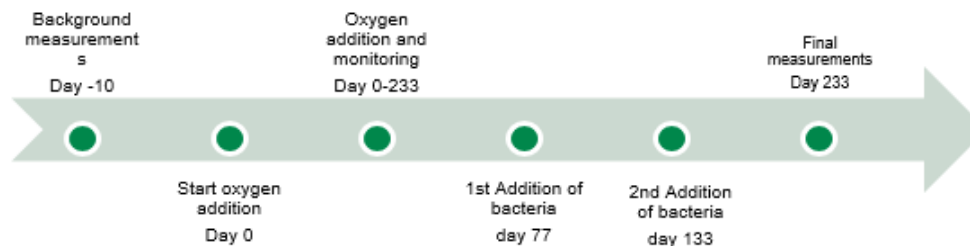
We conducted pilot tests in two test fields near the presumed hotspot area.

In test field 1, we only supplied oxygen whereas both oxygen and subsequently bacteria were added in field 2. This was we could investigate whether the supply of bacteria in field 2 yields an important increase in degradation relative to the field 1, where the naturally occurring bacteria are presumably adapted to degrade phenoxy-acid pesticides. In both fields we measured the concentration of phenoxy-acid pesticides, oxygen levels and microbial parameters before each activity as shown in the diagrams below.

Test field 1: Oxygen addition



Test field 2: Oxygen and bacteria addition



Contaminated site description

The groundwater at the site is contaminated with high levels of phenoxy-acid pesticides and a small amount of other pesticides such as BAM, hexazinone, etc. It has not been possible to locate the hotspot area despite extensive investigations. However, in the upper sandy aquifer, phenoxy-acid pesticide concentrations are above 100 µg/l (Maximum allowed concentration level is 0,1 µg/l). During the pilot tests, extensive monitoring was carried out showing significant variations in the content of phenoxy-acid pesticides in the same well as well as in wells with a distance of less than 2 meters. In connection with the installation of test fields, another 15 wells were drilled at the site to be used as injection and monitoring wells.

The site is located on the island of Lolland, Southern Denmark at a quite heavily hilly terrain, and in an area of very complex geology and hydrogeology. The local geology shows that the postglacial layers consist of peat, clay and silt undelain by an upper layer of moraine clay. Beneath this clayey layer, a sandy layer with local distribution (terrestrial sand) is seen at parts of the site. In the other pars, the upper moraine rests directly on a middle layer of moraine clay. Below this layer, lies the upper sandy aquifer that comprises the focus area of the pilot tests.

Results from the pilot tests

Oxygen addition

Addition of oxygen in the sandy aquifer was done using diffusers. Controlling oxygen addition was uncomplicated. The installation of diffusers in the wells has also been easy, and it has been possible to add the desired amount of oxygen to the aquifer. Oxygen distribution/migration was very different in the two test fields. In test field 1, the oxygen concentration remained low, despite an increased supply. On the other hand, in test field 2, we obtained a good distribution of oxygen throughout the test field.

Addition of bacteria

Addition of bacteria was carried out by injecting an inoculum consisting of *Sphingomonas herbicidovorans* MH in screened wells and then mixing it into the groundwater by recirculation. The method was easy to perform in practice, but subsequent measurements showed that the bacteria were unable to spread downgradient of the injection wells. In future projects alternative methods of bioaugmentation should be considered to ensure a greater migration spread of the bacteria, for example by direct push or injection into multiple wells. Results showed a higher abundance concentration of bacteria in well B2, indicating that recirculation did not lead to a homogeneous spread of bacteria between the two injection wells.

Microbial measurements during the pilot test period showed that the added bacteria *Sphingomonas herbicidovorans* MH were not transported in the soil (regardless of depth) - at least not to an extent that could distribute them to the nearest monitoring well, approximately 50 cm downgradient the injection wells. The results also showed that *Sphingomonas herbicidovorans* MH were able to survive in situ for longer periods (months) and remain metabolically intact with respect to their ability of degrading dichlorprop.

Assessment of the degradation of phenoxyacid pesticides and related mechanisms

The results show a decrease in the concentration of dichlorprop in almost all monitoring wells as the conditions changed to aerobic and bacteria was added. At the end of the pilot test, the concentrations of dichlorprop in both test fields were below the detection limit.

However, decreasing concentrations can not stand alone as proof of degradation, so a number of microbial analyses have also been performed to strengthen the evidence of degradation with several lines of evidence. In spite of the extensive monitoring of pesticide concentrations on the site, it is difficult to draw conclusions about the occurrence of degradation. Interpretation of results is complicated by several factors:

- There is a natural variation in the concentrations of phenoxy-acid pesticides. The highest concentrations of dichlorprop are found in the deepest well screens, where oxygen distribution was lowest.
- The starting concentration of dichlorprop in the upper well screens has generally been very low. At the same time, these are the filters where oxygen concentration has increased the most. There is a disappearance of dichlorprop in these filters, but the very low starting concentration makes it difficult to draw a clear conclusion about the cause.
- Some filters show that the content of dichlorprop rises sharply after oxygen supply. This may be due to either variations in flow pattern at the site or that the supply of oxygen increases the release of dichlorprop from organic material or immobile pockets.

The microbial analyses have shown the following:

Prior to injecting bacteria, low bacterial density and a very homogeneous community with low bacterial diversity was seen. A low diversity (taxonomic as well as functional) will likely have a negative impact on the ability of natural bacteria to break down environmentally-harmful substances such as pesticides.

- Mineralization experiments prior to injection showed that the soil does not contain naturally occurring microorganisms that can degrade dichlorprop in the presence of oxygen. Therefore, it is unlikely that the supply of oxygen in test field 1 has caused such stimulation of the natural biota that the drop in the dichlorprop concentration is due to degradation.
- Mineralization experiments after injection of bacteria (based on water samples from monitoring wells in test field 2) also showed that there are no microorganisms among the natural microbiota capable of decomposing dichlorprop. Therefore, it is unlikely that the supply of oxygen and bacteria in test field 2 has caused such a stimulation of the natural biota that the decrease in the concentration of dichlorprop in the monitoring wells is due to degradation.
- Mineralization experiments with water samples from the wells, in which *Sphingomonas* were detected (i.e., from the bacterial injection wells) showed a large degradation potential. It is therefore expected that biodegradation of dichlorprop occurs in these wells in test field 2. A possible explanation of the decreasing dichlorprop concentrations in the downgradient wells in test field 2 could be that the groundwater in these wells has flowed through the bioactive zone between B1 and B2 and been treated in the process.

As mentioned earlier, the results of site measurements show that there is a sharp decrease in the concentration of dichlorprop by oxygenation. It is not possible to conclude whether this is due to degradation or other processes since data from the mineralization experiments do not exhibit degradation potential in the monitoring wells - only in those wells where the bacteria were injected. A possible explanation for the lack of degradation potential in mineralization attempts may be that naturally occurring bacteria can not degrade dichlorprop to end (mineralization), which would mean a decrease of the parent compound, as observed on situ.

In several wells, a sharp decrease in the concentration of dichlorprop coincides with oxygen breakthrough, but no degradation is observed in the mineralization experiments from the same wells. This indicates that the decrease in the concentration of dichlorprop is not due to processes around the well, but inflow of treated groundwater that has passed through the bioactive zone created between the injection wells.

The pilot test illustrates the need for several lines of evidence when it comes to documenting degradation in the field.

Perspectives - Evaluation of full scale applicability

Due to the complexity of the hydrogeological and contaminant setting at Skelstøfte, it has been difficult to draw unambiguous conclusions from the pilot study. It is possible that better results would have been obtained by performing the test in larger test fields, so that sampling and oxygen / bacteria injection would have a smaller impact on the pore volume. Regarding future application of the technology for in situ remediation, we would like to highlight the following lessons learnt:

- Adding oxygen is a cheap and easy process. It is sufficient to add oxygen to the bottom of the magazine as buoyancy will ensure the vertical distribution of the oxygen.
- Addition of bacteria in screened wells is also an easy process. However, the bacteria were not transported as much with groundwater as expected. For larger projects, alternative methods must be used. These could be the addition of bacteria using direct push or other types of pressurized injection to ensure a better distribution within the field. It is possible that by addition of oxygen and bacteria in a transect, as in test field 2, a bioactive zone can be established through which flowing groundwater can be treated. It is cheap and easy to maintain aerobic conditions in a zone as long as the oxygen supply continues. This method can therefore be considered an alternative to pump and treat systems. An estimate of costs shows that the method can be more cost-effective compared to offset pumping, primarily due to lower operating costs.

- Mobilization of metals as a result of soil oxidation in groundwater aquifers may occur. In sandy aquifers it is estimated that mobilization will be limited. However, in limestone magazines, a significant migration of especially arsenic may occur due to the low K_d values and high flow rates in fractures. This risk must be taken into account when remediation is planned close to drinking water wells.

1. Indledning

Det vurderes, at en væsentlig del af pesticidforureningen af det danske grundvand stammer fra punktkildeforureninger. Ved en pesticidpunktkilde forstås en forureningskilde, som kan opstå, hvor der har været håndtering, opbevaring, spild og/eller bortledning mv. af pesticider. Punktkilderne er karakteriseret ved høje koncentrationer med pesticider på små arealer. Dette er i modsætning til fladekilder, hvor der konstateres lavere koncentrationer på større arealer som følge af bl.a. den landbrugsmæssige spredning af pesticider. På grund af den trussel, som pesticidpunktkilder vurderes at kunne udgøre over for grundvandet, er det således attraktivt at udvikle oprensningsteknikker til at fjerne disse koncentrerede forureninger for at forhindre udsivning til grundvandet i årevis fremover.

Der er i Danmark kun begrænsede erfaringer med oprensning af forurening, som er konstateret ved pesticidpunktkilder. Der har typisk været anvendt traditionelle pump and treat-afværgeteknikker. Man har dog forsøgt monitoreret naturlig nedbrydning, som afværgestrategi på pesticidforurening fra en losseplads, hvilket har vist positive resultater /1/.

Miljøstyrelsen har i 2011 afsluttet et udredningsprojekt vedr. mulige afværgeteknikker over for pesticidforurening knyttet til punktkilder i det danske grundvand /2/. Projektet konkluderede, at viden er meget begrænset i forhold til feltsituationen, mens der findes langt mere viden fra laboratorieforsøg. For forureninger med phenoxy-syrer (MCPA, MCPP, dichlorprop og 2,4-D samt relaterede metabolitter/urenheder som fx 4-PPP) anbefales det at undersøge potentialet for anvendelse af biologiske metoder /2/. Det kan ske ved monitoreret naturlig nedbrydning eller ved stimuleret nedbrydning; f.eks. ved tilsætning af ekstra ilt og næringsstoffer og/eller specifikke pesticidnedbrydende mikroorganismer.

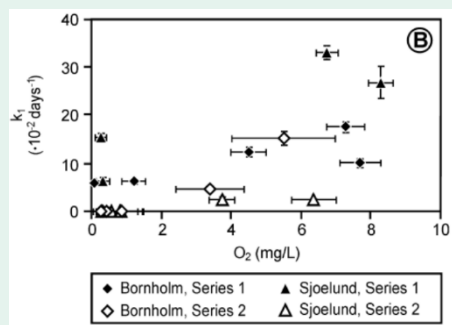
Nedbrydning af phenoxy-syrer udføres af bakterier, der besidder specifikke gener herfor /3/. Studier har vist, at specifikke bakteriekulturer er i stand til at vokse på phenoxy-syrer, når de er til stede i en vis mængde, som det f.eks. er tilfældet med punktkilder /3/. Det er denne proces, som laboratorieforsøg har vist kan stimuleres ved tilsætning af ilt. Endvidere er der potentiale for at øge nedbrydningshastigheden ved at tilsætte bakterier der kan nedbryde phenoxy-syrerne. Succesfuld anvendelse af monitoreret naturlig nedbrydning som afværgestrategi overfor phenoxy-syre-punktkilder er anvendt flere gange. I Danmark har det været anvendt på Sjølund Losseplads /1/. Stimuleret nedbrydning ved tilsætning af ilt er derudover blevet anvendt på en lang række forurenings-sager med olieforurening både i Danmark og i udlandet.

Stimuleret nedbrydning af phenoxy-syrer på punktkilder ved tilsætning af ilt er derimod, så vidt vides, endnu ikke afprøvet i felten /2/. Men er blevet grundigt undersøgt under laboratorieforhold med sediment og grundvand fra to danske lokaliteter /4/. I disse laboratorieforsøg, som beskrives i detaljer i boks 1, er det påvist, at tilsætning af ilt kunne stimulere den biologiske nedbrydning af phenoxy-syrer i jord og grundvand fra to forskellige lokaliteter. Der er i forsøgene ikke tilsat specifikke nedbrydere, hvilket betyder at de naturligt forekommende bakterier var i stand til at nedbryde pesticiderne. En iltkoncentration på 2-6 mg/l var nok til at stimulere nedbrydningen. Dog blev det konstateret, at nedbrydningsraten steg med stigning i iltkoncentrationen. De vigtigste forhold omkring forsøgene og resultater herfra er refereret boks 1. Det er netop en af konklusionerne fra disse laboratorieforsøg, der vil blive ført videre i denne pilotforsøg.

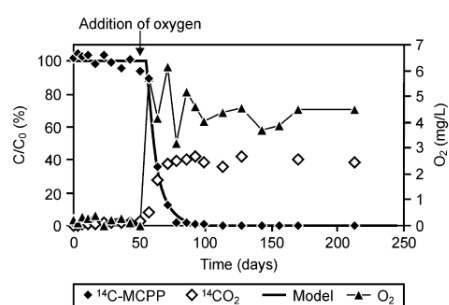
BOKS 1 Forsøg med aerob nedbrydning af pesticider jf. /5/

I en række flaskeforsøg blev der tilsat sediment og grundvand fra to forskellige danske pesticid-punktkilder: "Bornholm" er fra en vaskeplads og "Sjølund" er fra en losseplads. Der blev tilsat en lille mængde radioaktivt mærket MCPP som modelstof, for at kvantificere mineraliseringen (komplet omsætning til CO_2), men i øvrigt blev der ikke tilsat pesticider ud over de "naturligt" forekommende. På begge lokaliteter var der forurenet med en række forskellige phenoxysyrer samt urenheder herfra – deriblandt både dichlorprop, 2-CPP og 4-CPP som er aktuelle på Skelstofte. Koncentrationsniveauerne lå på mellem få til flere tusinde $\mu\text{g/l}$. Til flaskerne blev der tilsat forskellige mængder ilt, der resulterede i iltkoncentrationer i vandet på mellem $<0,3$ mg/l til ca. 8,5 mg/l, og som blev holdt stabile i hele forsøgsperioden ved løbende tilsætning af mere ilt. Sideløbende hermed blev en række flasker steriliseret med kloroform, for at verificere, at faldende koncentrationer var et resultat af mikrobiel nedbrydning.

Generelt opførte alle phenoxysyrerne sig stort set ens – dog blev urenhederne 2,6-MCPP og 2,6-DCPP nedbrudt lidt langsommere end de øvrige stoffer. Det betyder, at resultaterne for MCPP, som er vist nedenfor, kan overføres til også at gælde for dichlorprop. I et forsøg blev forholdene holdt anaerobe de første 50 dage, hvorefter ilt blev tilsat og holdt stabilt mellem 4 og 5 mg/l i de resterende knap 200 dage (figur b2). Som det fremgår af figuren skete der ingen nedbrydning i den anaerobe periode, mens nedbrydning skete hurtigt umiddelbart efter tilsætning af ilt.



Figur b1: Sammenhæng mellem 1. ordens nedbrydningsrate og iltkoncentration for nedbrydning af MCPP i sediment og grundvand fra to danske punktkilder. Fra /5/.



Figur b2: Effekt af tilsætning af ilt på nedbrydning af MCPP vist som procentvis koncentration af startkoncentrationen. Fra /5/.

I de flasker, hvor iltkoncentrationen blev holdt stabil gennem hele forsøgsperioden sås også en tydelig korrelation mellem iltindhold og nedbrydning. På figur b1 er 1. ordens nedbrydningskonstanten (fundet ved modellering af nedbrydningskurverne i hver af flaskerne) plottet som funktion af iltkoncentrationen for alle flaskerne fra de to lokaliteter. Som det fremgår, er det ikke alene tilstedeværelse af ilt eller ej, der betyder noget for nedbrydningshastigheden, men også selve iltkoncentrationen. Ved iltindhold over 2-4 mg/l ses dog allerede en hurtig nedbrydningsrate.

Der foreligger generelt kun resultater fra laboratorieforsøg mht. stimuleret nedbrydning af pesticider ved tilsætning af ilt. Derfor blev det besluttet at forsøge at videreføre de positive resultater fra laboratorieforsøgene til en test i felten. Denne test blev udført ved Skelstofte, hvor der var konstateret en forurening med phenoxysyrer pesticider, som var vurderet til at kunne udgøre en grundvandsrisiko. Da ressourcen er meget sparsom og sårbar i området, besluttede Region Sjælland at igangsætte afværgeforanstaltninger mhp. sikre indvindingen og grundvandsressourcen i området.

1.1 Projektets formål

Formålet med projektet var at udføre en pilotforsøg, hvor det undersøges, hvorvidt aerob nedbrydning af phenoxysyre-pesticider kan stimuleres ved tilsætning af ilt suppleret med tilsætning af specifikke pesticidnedbrydende bakterier. Strategien for pilotforsøget var at forsøge at tilføre ilt til den højpermeable zone i det øvre sandlag i det område, hvor der var konstateret de højeste forureningsniveauer med phenoxysyrer (især dichlorprop og 4-CPP). Der er forud for pilotforsøget gennemført en opsamling på erfaringer mv. i forhold til at opnå tilgængelige erfaringer med metoder til ilttilførsel som afværgemetode.

Pilotforsøget skal i det omfang det er muligt belyse følgende problematikker:

- Kan aerob nedbrydning af phenoxysyre-pesticider stimuleres ved tilførsel af ilt alene?
- Kan redoxforholdene i et magasin ændres ved tilsætning af ilt i en periode, der er tilstrækkelig til at stimulere nedbrydningen.
- Har bioaugmentering med specifikke bakterier en betydelig effekt i forhold til nedbrydningshastighed, eller er stimulering med ilt tilstrækkelig?
- Hvilke praktiske udfordringer er der i forbindelse med håndtering og injektion af bakterier – herunder opformering, transport og opbevaring

Projektet har omfattet følgende faser:

1. Litteraturstudie som omfatter en opsamling på erfaringer mv. i forhold til at opnå tilgængelige erfaringer med metoder til ilttilførsel som afværgemetode (som er vedlagt i Bilag A).
2. Detailprojektering af pilotforsøg (afsnit 3.1)
3. Feltarbejde (udførsel af pilotforsøg) og monitorering (afsnit 3.2)
4. Databehandling, dokumentation og afrapportering (afsnit 4)

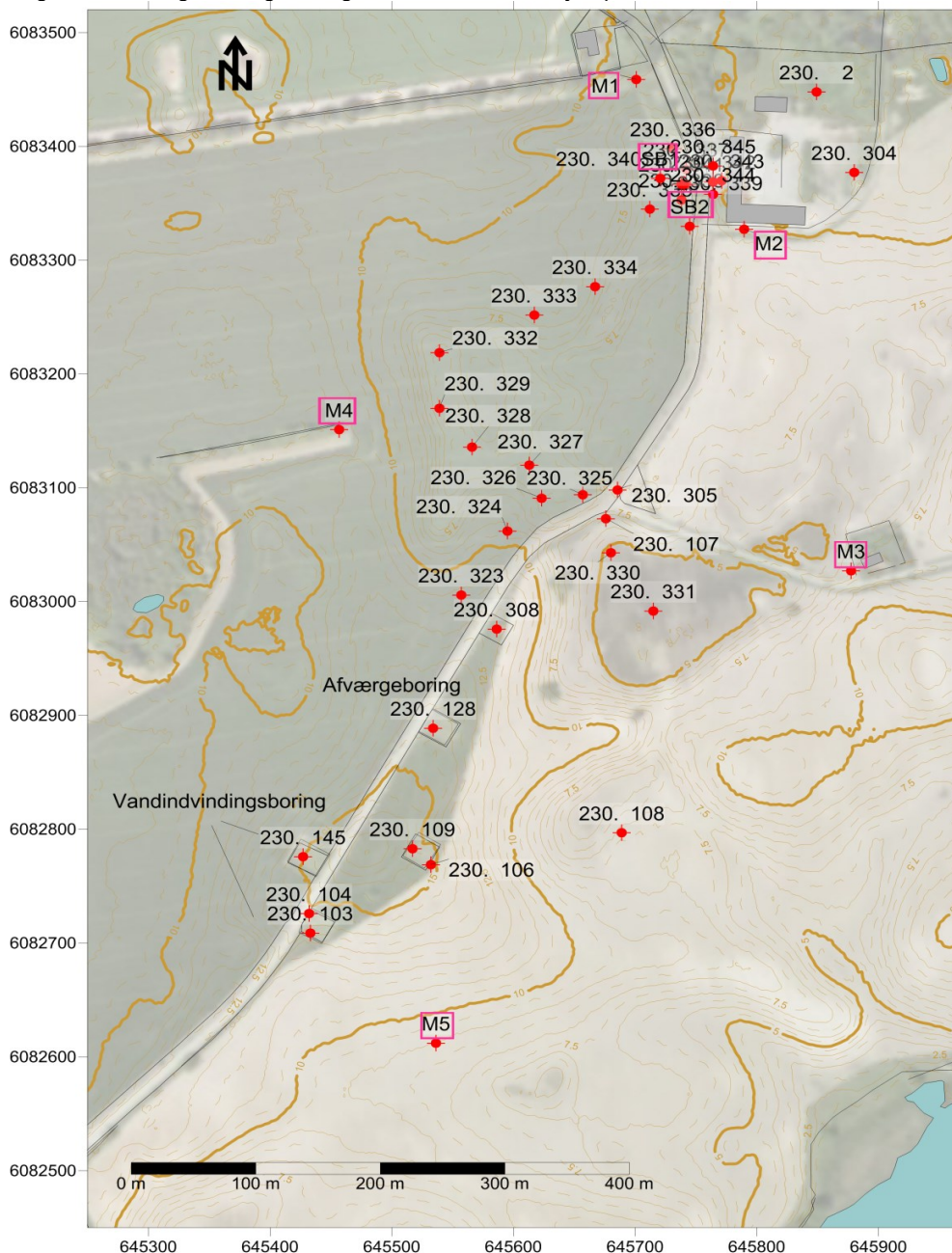
1.2 Rapportens struktur

Nærværende rapport beskriver baggrund og fremgangsmåden for pilotforsøget. Baggrunden for gennemførelsen af pilotforsøget er beskrevet i kapitel 2, hvor lokaliteten, forureningsituationen og de hydrogeologiske forhold på Skelstofte er beskrevet. I kapitel 3 er der en omfattende beskrivelse af fremgangsmåden for pilotforsøget med en begrundet argumentation for valg af dimensionering og forskellige tekniske elementer. Forsøgets resultater og tilhørende diskussion kan læses i kapitel 4. Rapporten afsluttes med en opsamlende konklusion og erfaringer, som kan anvendes i forbindelse med en evt. opskalering af metoden. Som en del af dette projekt, er der i en indledende fase udført en litteraturgennemgang af metoder til iltning i lavpermeable lag. Dette er vedlagt i Bilag A og kort inddraget i afsnit 3.1. Projektet er udført i tæt samarbejde med Aarhus Universitet som har foretaget de mikrobielle analyser på lokaliteten. Resultater fra Aarhus Universitets analyser er inkorporeret i rapportens kapitel 4. I Bilag B er der vedlagt et selvstændigt notat fra Aarhus Universitet, hvor metoder og resultater beskrives i flere detaljer.

2. Beskrivelse af lokaliteten

2.1 Baggrund

I området omkring Skelstofte Kildeplads blev der i 1994 konstateret et højt indhold af pesticider i to indvindingsboringer. Kilden til forureningen blev lokaliseret til Skelstofte Avlsgaard (herefter kaldet Skelstofte), som ligger 1 km nord for kildepladsen. På Skelstofte har der været en, nu nedlagt, indendørs vaskeplads, som har været tilsluttet et drænsystem med boringer uden bund. Placering af vaskepladsen er vist på situationsplanen i Bilag C. Orbicon har for Region Sjælland foretaget en afgrænsende undersøgelse i perioden 2010-2012 /6/ samt en mere detaljeret undersøgelse i kildeområdet i perioden 2012-2013 /7/. Det er disse to undersøgelser, der udgør datagrundlaget for det videre arbejde på Skelstofte.



Figur 2.1 Oversigtskort over hele området. Den blå linje angiver tværsnittet i Figur 2.2

Undersøgelserne har bekræftet, at kilden til den konstaterede forurening med dichlorprop ved Skelstoftes Kildeplads stammer fra den tidligere vaskeplads, som dermed udgør en risiko for den aktuelle vandindvinding samt selve grundvandsressourcen i området.

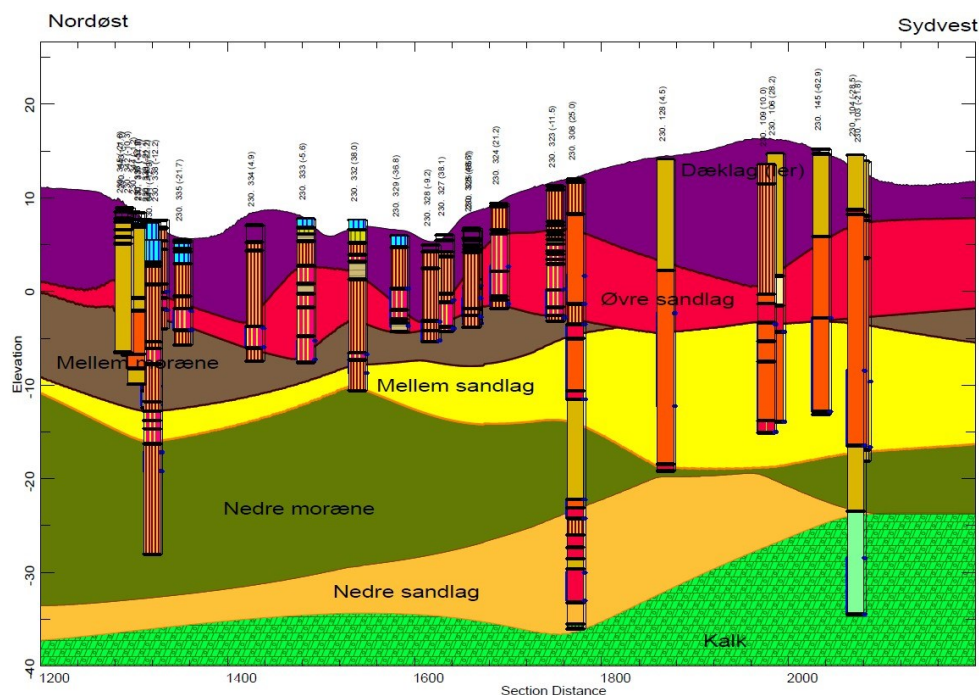
Region Sjælland har som tidligere nævnt besluttet at igangsætte afværgeforanstaltninger over for denne grundvandsrisiko. Dette gøres ved dels at iværksætte en afværgepumpning i det øvre og mellem sandlag med henblik på afskæring af fanen, så indvindingen ved Skelstoftes Kildeplads kan sikres så hurtigt som muligt. Derudover har regionen besluttet, at gennemføre en test med henblik på at undersøge muligheden for stimuleret aerob nedbrydning af forureningen med phenoxysyrer i kildeområdet. Det er denne test, som dette projekt tager udgangspunkt i.

I de efterfølgende afsnit er der foretaget en kort beskrivelse af de geologiske og hydrogeologiske forhold i og omkring lokaliteten samt den konstaterede pesticidforurening.

2.2 Geologi og hydrogeologi

2.2.1 Overordnet geologi

Lokaliteten ligger i, et for lollandske forhold, ret kraftig kuperet terræn, og i et område med en meget kompleks geologi og hydrogeologi. I forbindelse med den afgrænsende undersøgelse, er der udarbejdet en geologisk model for et større område omkring lokaliteten og Skelstoftes Kildeplads /6/. Figur 2.2 viser den overordnede geologi i området, som er tolket på baggrund af modellen /6/.

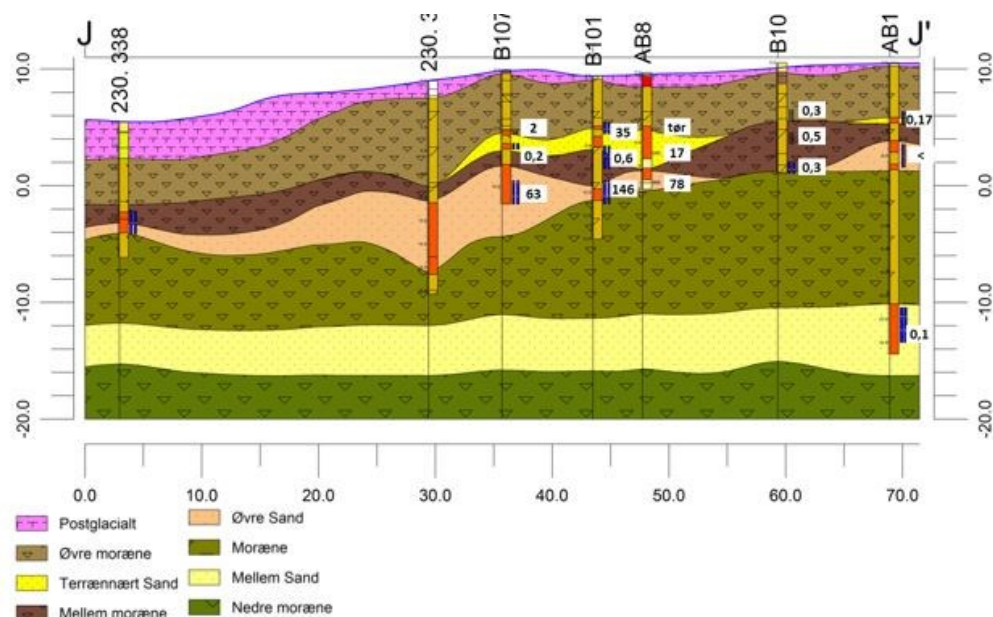


Figur 2.2 Et geologisk snit gennem den hydrostratigrafiske model, udarbejdet ifm. undersøgelserne i 2010 /6/. For placering af tværsnittet, se Figur 2.1

Modellen omfatter området fra Skelstoftes Kildeplads til området nord for den tidligere vaskeplads. I modellen er der medtaget tre sandmagasiner til at repræsentere geologien i området. Det fremgår af Figur 2.2, at der på kalken hviler et nedre sandlag (nedre sand), her over en nedre moræne med meget varierende mægtighed og her over et mellem-sandlag (mellem sand), der er udbredt i hele området. Over det mellem sandlag er endnu et morænedække, der flere steder er gennembrudt af smeltevandsaflejringer af øvre sandlag (øvre sand). Endnu en moræneler udgør, sammen med postglaciale aflejringer, dæklagene over øvre sandlag.

2.2.2 Lokal geologi i kildeområdet

I forbindelse med den detaljerede undersøgelse i kildeområdet, er der udført en del supplerende borer, som har bidraget til tolkningen af den mere lokale geologi i dette område/7/. I Figur 2.3 er vist et profilsnit fra kildeområdet. Placering af snittet kan ses på Figur 2.6. på profilen angives også indholdet af phenoxysyrer pesticider som diskuteres i afsnit 2.3.



Figur 2.3 Tværsnit af kildeområdet ved Skelstoftede der viser enheden af terrænnært sand mellem øvre og mellem moræner samt indhold af phenoxysyre-pesticider i vandprøver i µg/l. /7/ Se Figur 2.4 og Bilag C for placering af tværsnit.

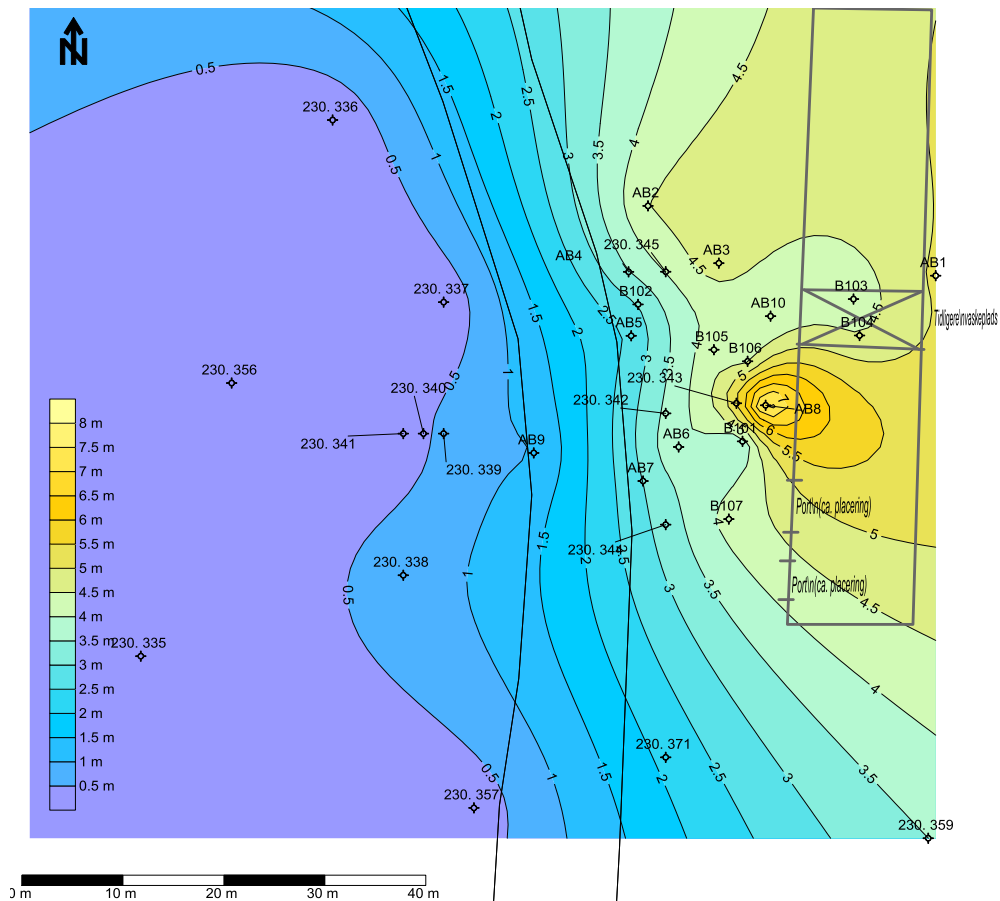
Den lokale geologi (Figur 2.3) viser, at der under de postglaciale lag, der ud over tørv og gytje også består af ler og silt, træffes moræner (øvre moræne), der i kildeområdet typisk er forvitret ned til 3-4 m u.t., dog endnu dybere bl.a. omkring borerne B105 og B106.

Under den øvre moræne ses et sandlag med lokal udbredelse (terrænnært sand). Det terrænnære sand er ikke udbredt i hele kildeområdet, men ses i borerne B107, B101 og AB8. I de øvrige områder hviler det øvre moræne direkte på mellem moræne.

Under det terrænnære sand/øvre moræne findes et lag af moræner, der ikke er forvitret (mellem moræne). Denne moræne er typisk grå, sandet og siltet.

Mægtigheden af det øvre sandmagasin er i høj grad påvirket af overfladen af det underliggende morænelag (moræne), som er en sandet og siltet uforvitret moræne. Denne moræne, der har en mægtighed på 8-12 m, hviler igen på mellemste sandmagasin i omkring kote -12 m i kildeområdet.

Figur 2.4 viser dybden af redoxgrænsen, baseret på farveskift i borerne jf. boreprofilerne i forbindelse med /6,7/. Dybden til redoxgrænsen er generelt mindre end 1 meter vest for Pederstrupvej, hvilket skyldes dæklagene af tørve- og gytjeaflejringer. Øst for Pederstrupvej stiger dybden til redoxgrænsen generelt gradvist i øst-nordøstlig retning. Ved boring AB8 gennembrøder redoxgrænsen dæklagene af moræner, der her er 4,6 m tykke, og når ned i mere end 7 meters dybde i det underliggende terrænnære sandlag. I borerne B105 og B106, der ligger tæt ved AB8, optræder oxideret moræner under den reducerede ler i 7-8 m dybde, sandsynligvis betinget af, at der er gode betingelser for nedsivende oxideret grundvand i dette område. Redoxforholdene i det øvre del af magasinet /6, 7/ kan beskrives som "lettere" aerobe eller nitratreducerende.

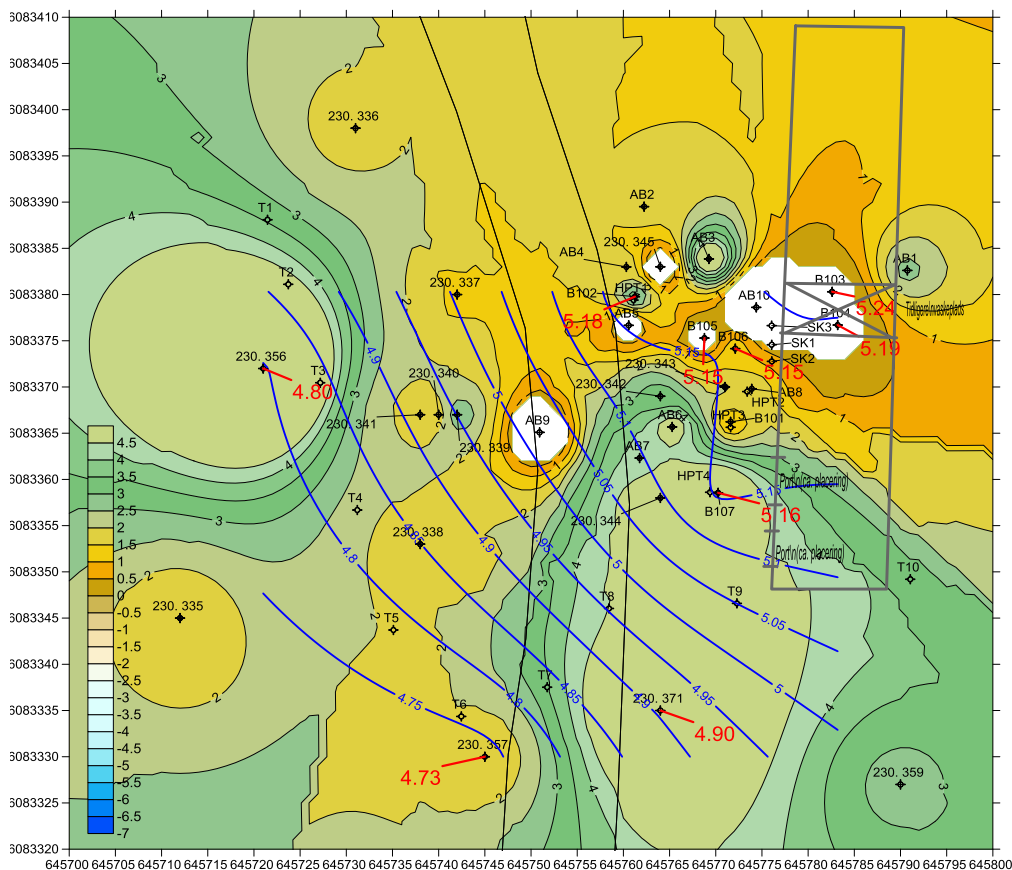


Figur 2.4 Dybden til redoxgrænsen baseret på farveskift i borer /7/ og placering af J-J' tværsnit

2.2.3 Lokal hydrogeologi

Strømningsretningen i det øvre sandlag er syd/sydvest mod Skelstoftes Kildeplads, som ligger ca. 1 km nedstrøms /6/. Det øvre sand fungerer dermed som en primær spredningsvej for pesticidforureningen væk fra kildeområdet. I forbindelse med den detaljerede undersøgelse i kildeområdet /7/ er der gennemført en synkronpejling den 12. april 2013, hvor udvalgte filtre i det øvre sandmagasin er pejlet med dataloggere. I Figur 2.5 er vist det resulterende potentialebillede, som viser en sydvestlig potentialehældning i kildeområdet /7/.

Der er en kraftig nedadrettet gradient fra den terrænnære moræneler, via det terrænnære sandlag, mod det underliggende øvre sand. Vandspejlet i dette lag står i ca. kote 5 m mens vandspejlet i ler står i ca. kote 6 m /7/.



Figur 2.5: Ro-potentialet i øvre sand d. 12. april 2013 (blå kurver). Baggrundskonturerne angiver den tolkede mægtighed af de "øvre" sand. I en række borer, beliggende i de hvide/lysegrå områder er det "øvre" magasin ikke truffet, f.eks. i AB9, AB10, B103 og B104. /7/

Der er bestemt horisontal hydraulisk ledningsevne i forbindelse med den detaljerede undersøgelse i kildeområdet foretaget sluttest i fem borer, B101-B102 og B105-B107 til bestemmelse af den lokale hydrauliske ledningsevne (se Tabel 2.1).

Filter	Dybde m u.t.	Hydraulisk ledningsevne m/s
B101-1	9-11	$6,4 \cdot 10^{-6}$ – Øvre sand
B101-2	6-8	$3,4 \cdot 10^{-5}$ – Øvre sand
B101-3	4-5	$2,9 \cdot 10^{-7}$ – Øvre sand
B102-1	11,5-13,5	$3,7 \cdot 10^{-6}$ – Øvre sand
B102-2	9-10	$3,4 \cdot 10^{-6}$ – Moræneler
B102-3	6,5-7,5	$2,1 \cdot 10^{-8}$ – Moræneler
B102-4	4-5	$4,9 \cdot 10^{-8}$ – Moræneler
B105-1	9,1-11,1	$1,1 \cdot 10^{-5}$ – Moræneler med sandslirer

Tabel 2.1 Hydraulisk ledningsevne i kildeområdet bestemt ved sluttests /7/

Den hydrauliske ledningsevne i filterne B102-2, B105-1 og B106-1 er højere end forventet i moræneler. Der er ikke umiddelbart en forklaring på den forholdsvis høje hydrauliske ledningsevne i B102-2, da jorden er beskrevet som fast moræneler. De høje hydrauliske ledningsevner i B105-1 og B106-1 tilskrives tilstedeværelsen af sandslirer.

En prøvepumpning af det øvre magasin viser også, at filterne har hydraulisk kontakt til det øvre sand, hvilket kan have indflydelse på spredningen af forureningen. De resterende værdi-

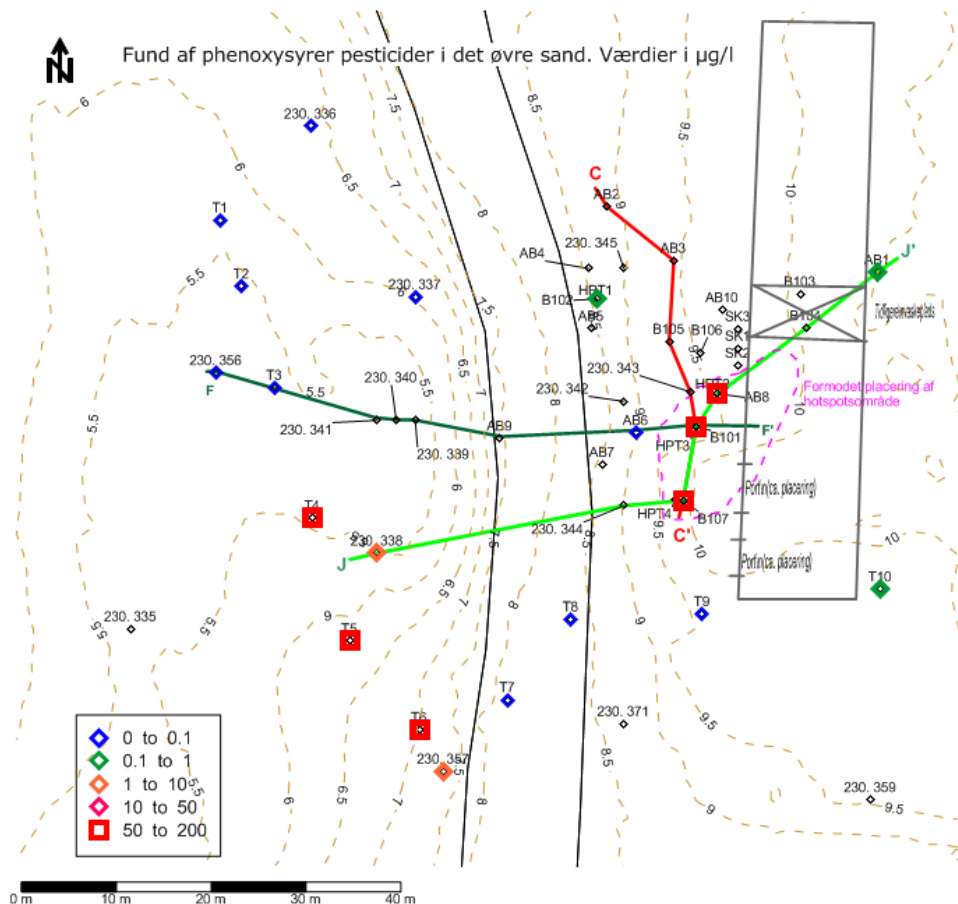
er vurderes at stemme overens med det forventede og derfor repræsentative for de lokalspecifikke forhold i kildeområdet /7/. De lokale hydrauliske forhold inddrages inden for de to testfelter i forhold til resultaterne fra testen med at tilsætte og fordele ilt i moræneleren.

2.3 Forureningssituationen

I forbindelse med den afgrænsende undersøgelse er der udtaget vandprøver fra to borer i kildeområdet, 230.356 og 230.357 samt fra et nedstrøms transekt bestående af 10 geoprobesonderinger (T1-T10) /6/, se Figur 2.6. Ved den detaljerede undersøgelse i kildeområdet er der udtaget vandprøver fra 10 afgrænsende borer (AB1-AB10) og 7 undersøgelsesboringer (B101-B107) /7/. Boringerne er filtersat i forskellige lag, dækkende over det terrænnære sand, det øvre og mellem moræneler samt det øvre sand. Flere af boringerne er prøvetaget flere gange og analyseret for pesticider. I det følgende er der en kort opsummering på resultaterne fra /6/ og /7/.

Der er påvist indhold af pesticider over detektionsgrænsen i samtlige vandprøver. Generelt ses en moderat påvirkning med bl.a. BAM, bentazon og hexazinon i flere vandprøver samt indhold af triaziner. Denne påvirkning vil dog ikke blive beskrevet yderligere i dette projekt, da det tidligere er vurderet, at det er phenoxysyrerne, herunder dichlorprop og 4-CP, som vil udgøre en risiko for den nærliggende indvinding og selve grundvandsressourcen i området /6,7/.

Figur 2.3 viser et tværsnit, som løber fra den vestlige del af kildeområdet mod øst. Placeringen af profilsnittet er endvidere angivet i Figur 2.6 og Bilag C.



Figur 2.6 Fund af phenoxysyre-pesticider i øvre sand samt formodet placering af et hotspotsområde. Derudover er angivet placering af profilsnittet J-J' og C-C' og F-F' /7/

De højeste koncentrationer af phenoxysyre-pesticider er truffet i det øvre sandlag, hvor den kraftigste forurening ses i borerne AB8, B101 og B107 (som tidligere vist i Figur 2.3). Der er her konstateret indhold på op til 120 µg/l for dichlorprop og 5 µg/l for 4-PPP svarende til indhold på op til ca. 150 µg/l for summen af phenoxysyrer pesticiderne /7/. Udbredelse af phenoxysyrer pesticider i hele kildeområdet er vist i Figur 2.6.

Det har ikke været muligt ud fra historiske oplysninger at lokalisere et egentligt kildeområde med pesticider. Det er oplyst, at pesticiderne er håndteret på og omkring den tidligere vaskeplads. Men en nærmere indkredsning af området, hvor pesticiderne har været håndteret, herunder opblanding og rengøring har ikke været mulig /7/.

Den detaljerede undersøgelse i kildeområdet indkredsede dog et muligt hotspot på baggrund af koncentrationerne i vandprøverne samt den geologiske forståelse af området til at have et areal på ca. 150-200 m² (se Figur 2.6). Det er dog endnu ukendt hvordan/hvorfra spildet er opstået. Det er i forbindelse med den detaljerede undersøgelse vurderet sandsynligt, at nedrivning til det øvre sandlag sker i området ved AB8 og B101, som også er karakteriseret af meget oxideret ler, som typisk er mere opsprækket (se Figur 2.4) /7/.

Den vedvarende forureningsflux af pesticider, som er konstateret i forbindelse med undersøgelserne, tyder på, at der må ligge en markant masse af pesticider i et hotspot. Det har ikke været muligt at kortlægge den præcise placering af hotspottet. Der er tidligere estimeret, at der teoretisk udvaskes omkring 116 g/år af phenoxysyrer fra Skelstofte, beregnet ud fra koncentrationer i transektet T1-T10 /6/. Hvis der antages et kildeområde på ca. 150 m², som vist på Figur 2.6, og en nettoinfiltration på 200 mm/år, må koncentrationen i porevandet i moræneleren forventes at være ca. 3.300 µg/l.

I forbindelse med den detaljerede undersøgelse i kildeområdet, er det forsøgt at lokalisere dette hotspot i moræneleren, hvorfra det formodes at forureningen udvaskes med regnvandet dels til det terrænnære sand og dels til det øvre sand. Der er dog generelt påvist lave indhold (>10µg/l) af phenoxysyrer i morænelagene, som overlejer det øvre sand. Det højeste niveau lå på ca. 14 µg/l 4-PPP /7/. Det vil sige, at der kun er konstateret indhold af phenoxysyrer svarende til ca. en faktor 250 mindre end de forventede koncentrationer i porevandet i morænelaget.

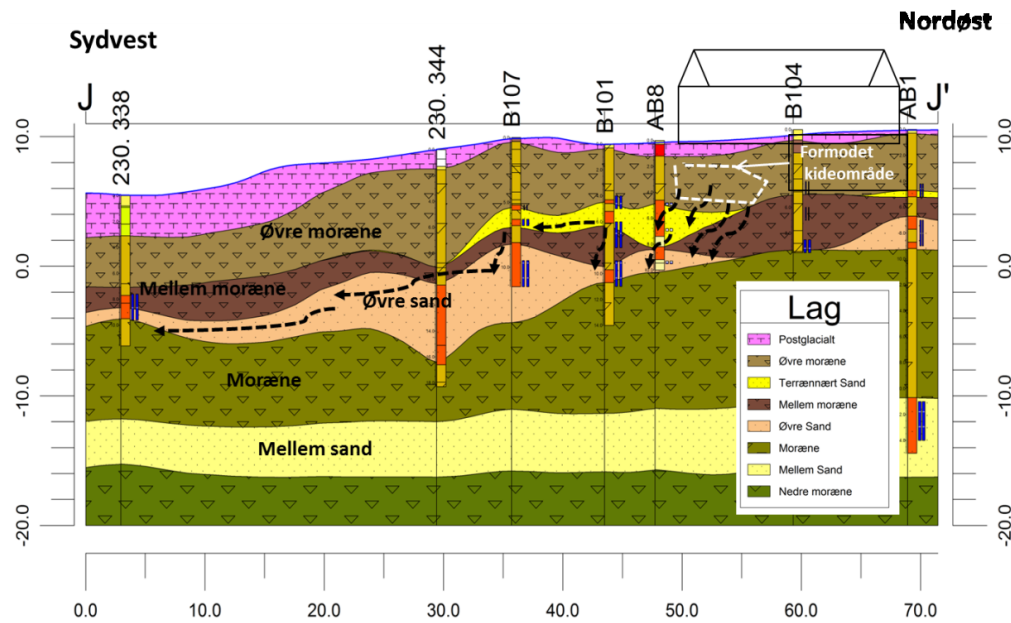
På baggrund af resultaterne fra de to undersøgelser og det omfattende datagrundlag, der er blevet generet, er det besluttet at udføre pilotforsøget med stimuleret aerob nedbrydning i det øvre sand, i området omkring borerne B01 og B107 hvor de højeste koncentrationer af dichlorprop er konstateret i vandprøver fra det øvre magasin. Udvælgelsen af testfelterne og detailprojektering af pilotforsøgene er beskrevet i de efterfølgende afsnit.

2.4 Spredningsveje og revideret konceptuel model

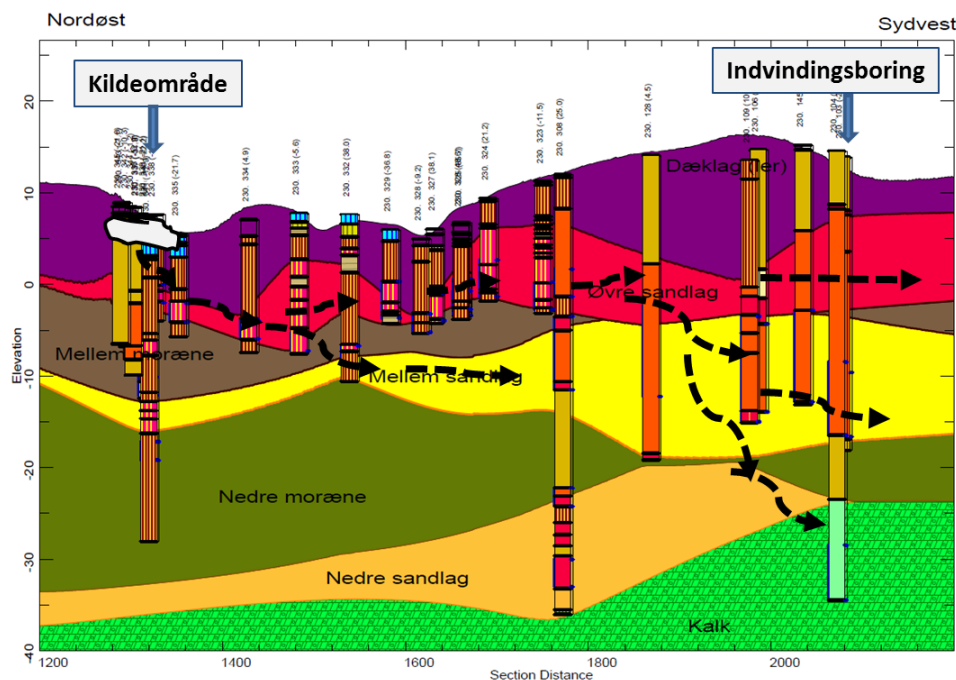
På nedenstående figurer ses en overordnet konceptuel model for forureningsspredningen ved Skelstofte. Figur 2.7 viser en kildenær konceptuel model ved Skelstofte. Det formodes, at der findes et hotspot i moræneler, hvorfra forurening udvaskes med regnvandet dels til det terrænnære sand og dels til det øvre sand. Der er en kraftig nedadrettet gradient fra den terrænnære moræneler, via det terrænnære sandlag, mod det underliggende "øvre sandlag". Hotspottet vurderes at ligge opstrøms boring AB8, muligvis i området mellem denne boring og vaskepladsen. Hotspottets størrelse kan være mindre end 15 m², hvis der er tale om et koncentreret spild. I det øvre sand sker der yderligere spredning med grundvandsstrømning.

På Figur 2.8 ses en konceptuel model for, hvordan forurening fra Skelstofte spredes til vandværkets kildeplads ca. 2,5 km nedstrøms. Bemærk, at navngivningen "Mellem moræne" i Figur 2.8 svarer til "Moræne" i Figur 2.7 samt "Dæklag" i Figur 2.8 svarer til "Øvre og mellem moræne" i Figur 2.7.

Vandværkets borer er filtersat i kalken, som overlejres af det nedre sandlag. Dette sandlag beskyttes af en nedre moræne med meget varierende mægtighed. Ca. 1,8-2 km sydvest for Skelstofte er mægtigheden af denne moræne kun 1-2 meter. Det mellem sandlag, der er udbredt i hele lokalområdet, adskilles fra det øvre sandlag af endnu et morænedække, i området tæt på Skelstofte. Dog ses der længere nedstrøms at morænedækket er flere steder er gennembrudt af smeltevandsaflejringer af øvre sandlag, dvs. det øvre og mellem sandlag er i direkte kontakt.



Figur 2.7 Kildenær konceptuel model



Figur 2.8 Kildefjern konceptuel model. Bemærk navngivning: "Mellem moræne" på Figur 2.8 svarer til "Moræne" på figur 2.7. "Dæklag" på figur 2.8 svarer til "øvre og mellem moræne" i Figur 2.7

Strømningsretningen i det øvre sandlag og det mellem sandlag er syd/sydvest mod Skelstofte Kildeplads, som ligger ca. 1 km nedstrøms /R1/. Det øvre sand fungerer dermed som en primær spredningsvej for pesticidforureningen fra Skelstofte vertikalt til det mellem sandlag og herefter horisontalt mod kildepladsen.

3. Udførelse af pilotforsøg

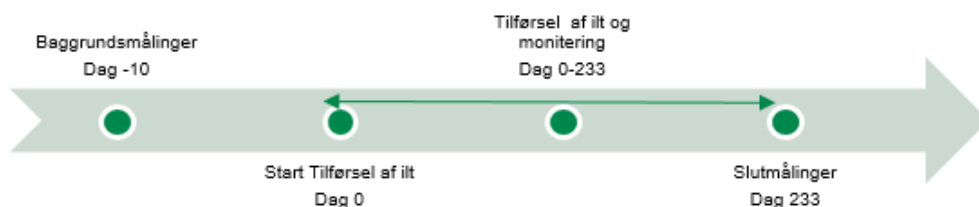
Med de udførte undersøgelser er der ikke påvist det forventede høje indhold af pesticider i det øvre morænelerlag, som vil kunne bidrage med den flux, der observeres i det øvre sand. På baggrund af undersøgelsens resultater blev det besluttet, at teknologiudviklingsprojektet kun omfattede sandmagasinet og blev udført som pilotforsøg i to mindre afgrænsede områder. Pilotforsøget bestod i at tilføre ilt og bakterier i magasinet (øvre sand) med det formål at skabe en bioaktiv zone, der fungerer som et gardin mod nedsivende/tilstrømmende forurening.

I de efterfølgende afsnit er der en beskrivelse af selve konceptet for afværgemetoden, hvor der foretages nedbrydning af phenoxysyrer ved tilsætning af ilt, dimensionering af testfelterne samt en beskrivelse af den tekniske løsning til tilførsel af ilt.

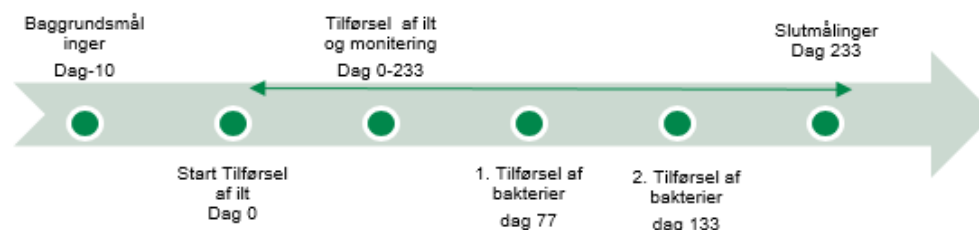
3.1 Etablering af testfelterne

Der blev etableret to testfelter i nærheden af det formodede hotspotsområde. I testfelt 1 er der udelukkende tilført ilt, mens der i testfelt 2 er tilført ilt og efterfølgende bakterier. Formålet med testfelt 2 er at undersøge om tilførsel af bakterier vil give en mærkbar forøget nedbrydning i forhold til det første testfelt, hvor de naturligt forekommende bakterier formodentlig er adapteret til at kunne nedbryde phenoxysyrer pga. den årelange tilvænning hertil. I begge pilotforsøgsfelter er der målt for indhold af phenoxysyrer, ilt og mikrobielle parametre før hver aktivitet som vist på nedenstående diagrammer. Det detaljerede monitoringsprogram og hyppighed ved monitoring er nærmere beskrevet i afsnit 3.2

Testfelt 1: Kun iltning



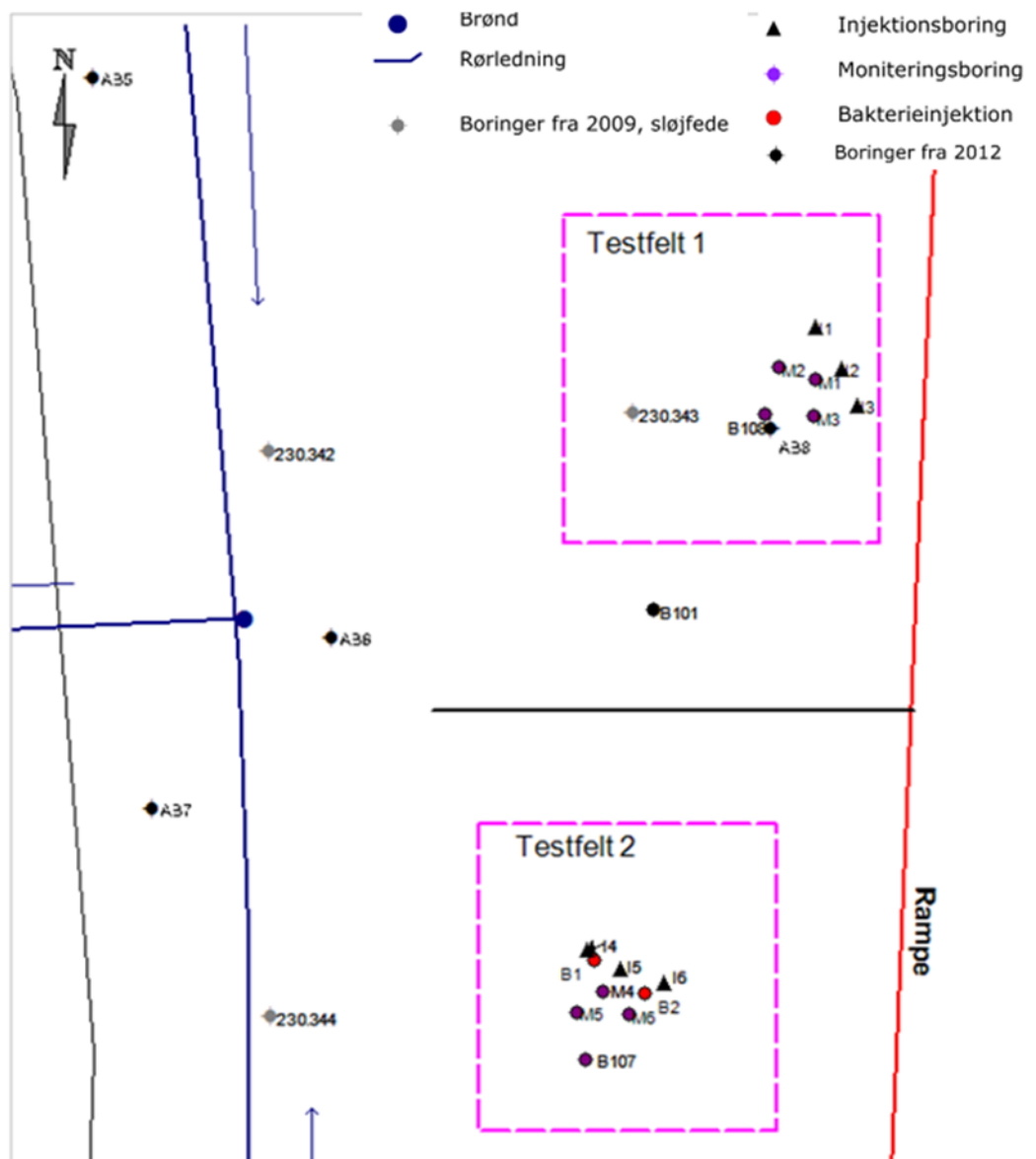
Testfelt 2: Iltning og bioaugmentering, tidsforløb parallelt til ren iltning



Figur 3.1 Skitse over forløbet for pilotforsøg

Testfelternes præcise placering er vist på 2.6, afsnit 2, og valgt på baggrund af de observerede høje koncentrationer af pesticider i vandprøverne (se Figur 2.6) og den formodede strømningens retning.

Figur 3.2 viser placering af testfelterne foran laden samt et geologisk tværsnit over testfelterne. Ropotentialet for det øvre magasin kan også ses på figuren. Testfelt 2 er placeret nedstrøms testfelt 1 for at undgå påvirkning af de tilsatte bakterier.

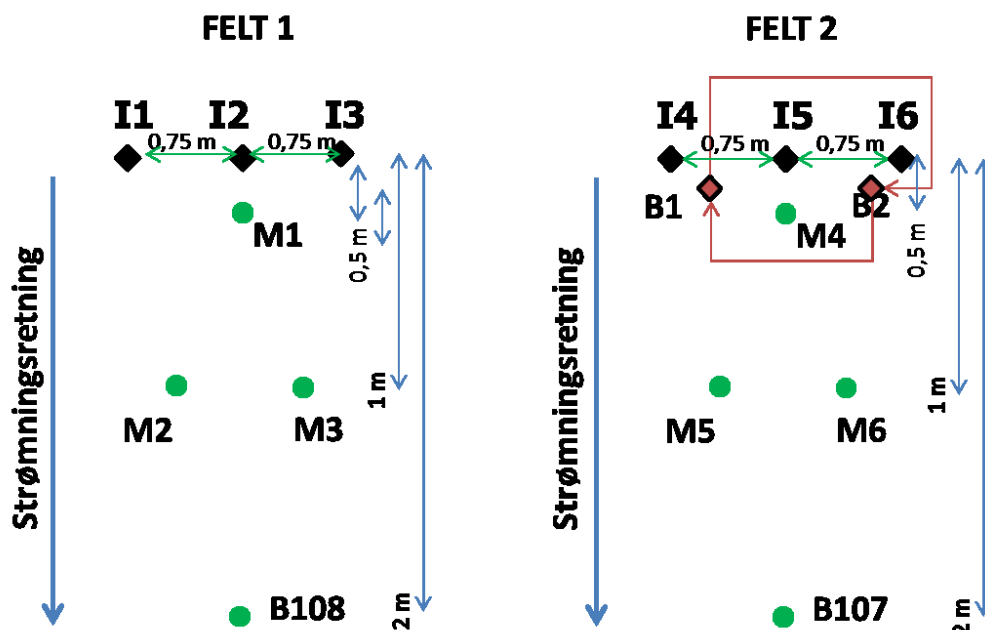


Figur 3.2 Placering af testfelt 1 og 2 og ropotentialet for det øvre sand, samt placering af tværsnit D-D'. Skala (1:150). Figuren er vedlagt i Bilag C.

Parameter	Testfelt 1	Testfelt 2
Behandling	Ittning	Ittning og bioaugmentering
Eksisterende borer	AB8	B107
Areal (m ²)	4	4
Tykkelse af det øvre sand (m)	2	4
Strømningsretning	Vestlig/sydvestlig	Sydvestlig
Hydraulisk ledningsevne i øvre sand (m/s)	1,38 · 10 ⁻⁵ målt i B108	1,6 · 10 ⁻⁵ Målt i B107-1
Forureningsniveau jf. /7/ (µg/l)	>200 µg/l. målt i AB8 i marts 2014	70 µg/l Målt i B107 i marts 2014

Tabel 3.1 Beskrivelse af testfelter

Nedenstående Figur 3.3 viser en overordnet beskrivelse af forsøgsopstilling med angivelse af placering for injektions- og monitoringsboringer. I hvert af de to felter er der etableret tre monitoringsboringer (M1-M6) og tre iltinjektionsboringer (I1-I6). I felt 2 er der desuden to injektionsboringer til tilsætning af bakterier (B1-B2). Dimensionering af testfelterne er nærmere beskrevet i afsnit 3.1.4.



Figur 3.3 Principskitse for de to testfelter, I = Injektionsboringer til ilt, M = Monitoringsboringer og B = injektionsboringer til bakterier

3.1.1 Erfaringer fra litteraturstudiet

Der er udført en litteraturgennemgang omkring metoder til tilførsel af ilt, som er vedlagt i Bilag A. Gennemgangen havde fokus i tilsætning i lavpermeable lag, da ved opstart af pilotprojektet var tanken, at anvende ilt til oprensning af et hotspot område i moræneleren på Skelstoftø. Supplerende undersøgelser gjorde det dog ikke muligt at lokalisere forureningen i moræneleren i tilstrækkelig grad så det var muligt at gennemføre forsøget i de lavpermeable lag. Fokus for pilotforsøget blev i stedet rettet mod det underliggende øvre sandmagasin.

Vedrørende tilførsel af ilt i højpermeable lag er der fundet følgende tre metoder i forbindelse med litteraturgennemgangen:

1. Ilt kan tilsættes i ren gasform eller som atmosfærisk luft ved trykinjektion i vertikale boringer eller injektionsspyd.
2. Der kan installeres boringer, der langsom afgiver ilt (Waterloo emitter). Det drejer sig om at føre en porøs slange ned langs en sondering, hvorfra der sker en langsom diffusiv frigivelse af ilt.
3. Der kan installeres vandrette boringer, hvori slanger langsomt afgiver ilt til vandet ved diffusion.

Med udgangspunkt i ovenstående er der i dette projekt valgt en tilpasset metode, hvor ilten blev tilsat i ren gasform (for at mindske fortrængning af porevandet) ved brug af en keramisk diffuser. Princippet ligner Waterloo emitter, men i stedet for en porøs slange, anvendes der et keramisk filter, hvorigennem ilten blæses ud i mikroskopiske bobler (se afsnit 3.1.2).

3.1.2 Etablering af iltinjektionsboringer og installation af diffusere

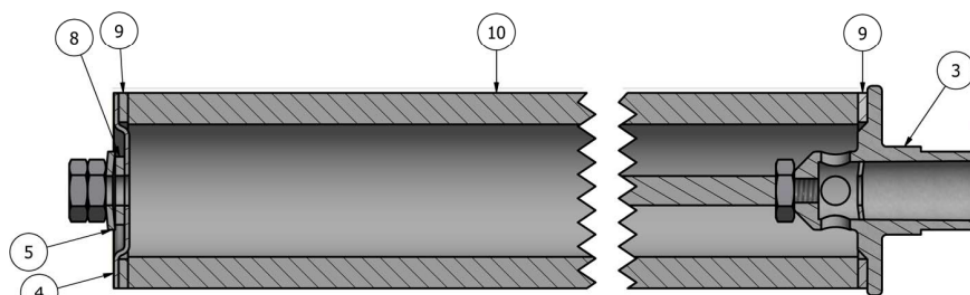
Til injektion af ilt i det øvre sandlag, er der som nævnt ovenfor i opstrøms i hvert af de to testfelter etableret 3 injektionsboringer, dvs. i den nordøstlige del af felterne, således at opløst ilt spredes med den naturlige grundvandstrømning. I testfelt 1 er der etableret injektionsboring I1 –I3 og i testfelt 2 er der etableret injektionsboring I4-I6 etableret. Placeringen af injektionsboringerne er vist på situationsplanen i Figur 3.2 og Bilag C.

Injektionsboringerne blev udført som forede 6" snegleboringer (se Foto 3.1). Boringerne blev boret til 0,5 m ned i moræneleren under det øvre sandmagasin. I testfelt 1 blev morænelerslaget truffet i ca. 9,5 m dybde og i testfelt 2 blev det truffet i ca. 12,5 m dybde.



Foto 3.1 Fores 6" snegleboring (tv) og diffusere (th)

Efter, at den ønskede dybde på boringerne var opnået, blev der installeret en keramisk diffuser (se Foto 3.1) på 60 cm. Diffuseren er fra firmaet Refractron og er udført i et porøst keramisk materiale med en porøsitet på 15 μm . Den lave porøsitet skal dels hindre fin partikulært materiale fra formation i at trænge ind i diffuseren, og dels for at give så små iltbobler som muligt for at få iltten opløst i vandet. På nedenstående figur er de teknisk data og opbygning vist.



Parts List			
ITEM	QTY	PART NUMBER	DESCRIPTION
3	1	930003	INLET CASTING, 316L S.S.
4	1	930009	END CAP, 304 SSSL
5	1	930010	3/8" DISHED WASHER, 304 SSSL
6	1	930033	3/8" 316 SSSL ROD - NO EXTENSION
8	1	930029	0.87" x 0.38" VITON GASKET
9	2	930028	2.5" x 1.75" VITON GASKET
10	1	110005	64-44-610, AF15 TUBE
10	3	ANSI B18.2.2 - 3/8 - 16	Hex Nuts (Inch Series) Heavy Hex Jam Nut

Figur 3.4 Datablad for diffusere

For at sikre en korrekt placering i boringerne, blev diffuserne fyldt med vand inden installeringen for at hindre opdrift. På diffuserne er der monteret 10 mm kobberør, som er ført frem til en iltstation. På kobberøret blev den ønskede længde markeret, så det kunne kontrolleres, at diffuseren stod i den ønskede dybde. Det vil sige, at de øverste 10 cm af diffuserne var placeret i sandlaget.

Det havde været ønskeligt at installere en diffuser over hele sandlagets tykkelse, men da diffuserens porer altid er åbne, ville tryktabet igennem den lange diffuser gøre, at ilten alligevel vil komme ud fra diffuserens øvre del. Ved at vælge en kortere diffuser er dette tryktab mindre. Det er undersøgt, hvorvidt der findes diffuserer hvis porerne åbner efter trykket er steget over 1,5 bar og derved resulterer i en jævn fordeling af ilt over diffuserens længde, men det har ikke været muligt at finde denne type diffuser.

Herefter blev forerørene trukket op samtidigt med, at det blev kontrolleret, at diffuserne forblev i den ønskede dybde. Det er valgt at lade jorden omkring diffuserne kollapse og dermed mindske den lidt mindre permabilitet, der er opstået i formationen omkring boringer i forbindelse med etableringen.

I takt med, at forerørene blev trukket op, er sandformationen faldet sammen omkring diffuser og kobberør. Fra overkanten af sandlaget til terræn blev der afproppet med bentonit pellets. Borningsafslutningen er udført med 100 mm betonrør med dæksel. På nedenstående Foto 3.2 ses opmåling af testfelt 1 inden opstart af borearbejdet og en færdig injektionsboring.



Foto 3.2 Opmåling af testfelt 1 (tv) og injektionsboring (th)

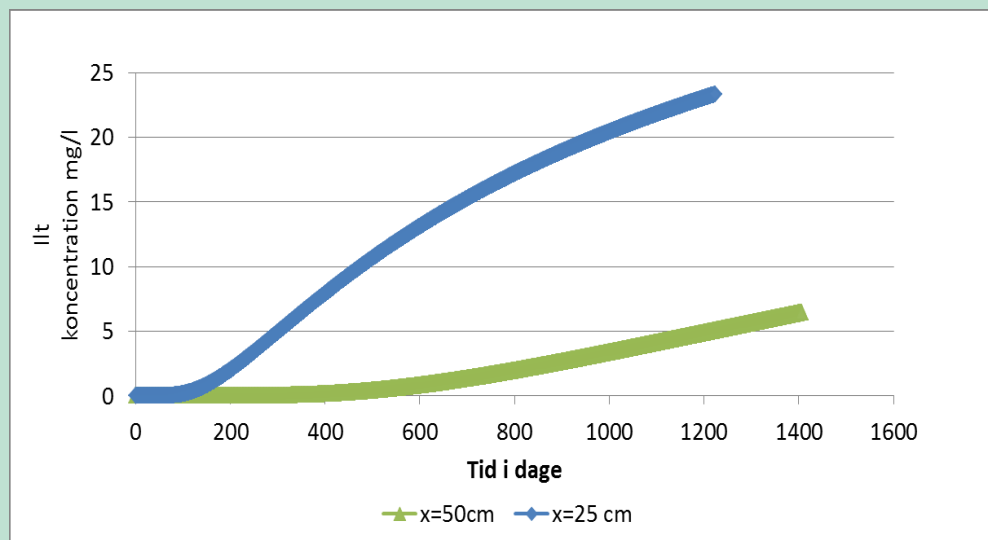
Placering og afstand mellem injektionsboringerne til ilt er valgt på baggrund af beregninger omkring ilt diffusion. Beregningerne er beskrevet i boks 2. Den indbyrdes afstand mellem injektionsboringerne blev valgt således, at de tre iltfaner, der genereres fra hver boring, kom til at dække hele cellens bredde.

BOKS 2 Beregning af ilt diffusion

Iltten, som injiceres igennem en diffuser vil sprede sig i nedstrøms retning ved advektion af det strømmende vand og på tværs af strømningsretningen ved hjælp af diffusion. Desuden forventes der en opdrift for gasboblerne fordi disse er lettere end vand. Derfor er det vigtigt at undgå dannelse af for mange og for store vandbobler, men i stedet opløse så meget ilt som muligt i vandet. Diffuserens lave porøsitet minimerer diameteren af gasboblerne.

Nedenstående diagram viser, hvordan ilt spredes ved diffusion jf. teoretiske beregninger. Når der injiceres ilt med diffuseren, vil der i grundvandet langs boringen være en iltkoncentrationen på 60 mg/l (som er mætningskoncentration). Da koncentrationen af ilt i det omkringliggende vand er tæt på nul, vil iltten diffundere hen mod den lavere koncentration. På figuren ses, hvad koncentrationen vil være i vandet i en afstand på hhv. 25 og 50 cm fra boringen i x retning (hvis strømningsretningen er i y retning, se som vist på figuren til højre).

Figur 3.5 Skitse for udbredelse af ilt ved diffusion fra injektionsboring efter 200 dage



Figur 3.6 Diffusion af ilt over tid. Mætningskoncentration i vand er 60 mg/l. Koncentrationen af ilt er beregnet i hhv. 25 afstand transversalt (blå kurve) og 50 cm (grøn kurve). Beregningen er forudsat at der ikke forbruges ilt under transporten og koncentrationen i pkt. 0 cm er konstant 60 mg/l.

Diffusionen styres af Ficks 2. lov $\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \partial^2 C / \partial x^2$

hvor D_{ef} er den effektive diffusionskoefficient (tortuositet x diffusionskoefficient). C er koncentrationen af ilt, t er tiden og x er afstanden. Tortuositeten τ er her antaget at være $\tau = \epsilon / \epsilon_0$ hvor ϵ er porøsiteten. Diffusionskoefficienten for ilt er $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ jf. /9/. Andre processer, såsom dispersion samt præferentielle kanaler, vil også lede til yderligere spredning. Der vil således fra hver injektionsboring dannes en "iltfane" som skitseret på Figur 3.5. Hvis der antages et worst case scenario, hvor spredning af ilt udelukkende styres af diffusionen, kan det forventes, at der vil gå ca. 200 dage før koncentrationen af ilt 25 cm fra boringen (målt fra diffuserens udkant) har nået til et niveau på ca. 2 mg/l (se Figur 3.5), En koncentration på 2 mg/l vurderes tilstrækkeligt for den mikrobielle overlevelse /R1/. I løbet af den tid har vandet bevæget sig ca. 2 meter nedstrøms igennem feltet ud fra den vurderede strømnings hastighed i øvre sand er på 0,015 m/dag. Det vil sige, at hele testfeltets bredde er "dækket" af iltfanen. Injektionsboringerne til ilt blev derfor placeret med ca. 0,5 meters mellemrum, så iltfanerne overlapper.

3.1.3 Etablering af monitorings- og bakterieboringer

Til at overvåge koncentrationen af opløst ilt, måle for indhold af pesticider og specifikke nedbrydere/gener i grundvandet og dermed dokumentere effekten af behandlingen over for forureningen, er der i de to testfelter etableret monitoringsboringer.

I hvert testfelt er der etableret 3 nye monitoringsboringer, som er udført med forede 6" snegleboringer til bunden af det øvre sand. I testfelt 1 er monitoringsboring M1-M3 etableret, desuden afvendes den eksisterende boring B108 at indgå i den efterfølgende monitoring. Alle boringer i felt 1 er filtersat med 2 m Ø63 mm filter. Boringerne er gruskastet med Dansand 3 filtergrus til 30 cm over filter og er afproppet til terrænen med bentonit pellets. Boringsafslutningerne er udført i 100 mm betonrør med dæksel.

I felt 2 er monitoringsboring M4-M6 etableret og den eksisterende boring B107 inddrages i monitoringen. I felt 2 har sandlaget en vertikal udbredelse på ca. 4 m, og her er monitoringsboringerne filtersat med 2 stk. Ø63 mm filter i hver boring. Mellem filtrene er der afproppet med 50 cm bentonit pellets for at hindre kortslutning mellem filtrene ved prøvetagning.

I testfelt 2 er der endvidere etableret 2 forede 6" boringer med 4 m Ø63 mm filter (B1 og B2), som er brugt til at tilsætte bakteriekultur.

I Tabel 3.2 er der en oversigt over boringsudbygningen i af monitoringsboringer og bakterieboringer de to testfelter.

Boring/ Filter nr.	Dimension Boring	Dimension Filter mm	Filtertop m u.t.	Filterbund m u.t.
M1	6"	Ø63	7,10	9,10
M2	6"	Ø63	7,00	9,00
M3	6"	Ø63	7,05	9,05
B108	6"	Ø63	7,70	9,70
M4-1	6"	Ø63	10,10	12,10
M4-2	6"	Ø63	7,50	9,50
M5-1	6"	Ø63	10,30	12,30
M5-2	6"	Ø63	7,80	9,80
M6-1	6"	Ø63	10,20	12,20
M6-2	6"	Ø63	7,90	9,90
B107-1	8"	Ø63	9,50	11,50
B1	6"	Ø63	8,20	12,20
B2	6"	Ø63	8,20	12,20

Tabel 3.2 Oversigt over boringsudbygning i monitoringsboringer og bakterieboringer

Placering af monitoringsboringerne er valgt således (se Figur 3.3), at de forventes at ligge indenfor det iltede område. Det er antaget, at den opløste ilt vil sprede sig fra injektionsboringerne ved advektion (med en hastighed på 4,2 m/år i det øvre sand) og ved diffusion. Diffusionen er en langsom proces, som vist i diagrammet i Boks 2. Opholdstiden i cellen er ca. 0,5 år (baseret på en strømningshastighed på 4 m/år), svarende til længden af monitoringsperioden. Den første monitoringsboring blev derfor placeret kun 50 cm fra injektionstraceen. Derefter blev der etableret to boringer i ca. 1 meters afstand. Endvidere indgik B108 og B107 i monitoringsprogrammet som ligger ca. 2 m nedstrøms iltinjektionstransectet (se afsnit 3.2).

3.1.4 Tilførsel af ilt og beregning af iltmængder

For at etablere og opretholde aerobe forhold i testfelterne er der blevet injiceret en mængde ilt, der overstiger det naturlige iltforbrug. Formålet var at opretholde en koncentration af opløst ilt i vandet på ca. 2-4 mg/l, som jf. erfaringerne fra laboratorieforsøg (boks 1 (afsnit 1)), er gunstig for stimulering af nedbrydningen.

Boks 3 Beregnede iltmængder med baggrund i jordens iltforbrug

Der er udtaget jordprøver fra kildeområdet ved Skelstøtte, hvor der i laboratoriet er udført målinger af jordens iltforbrug, herefter kaldt OD laboratorieforsøg. Jordprøverne er udtaget fra det terrænnære sandlag. Det har desværre ikke været muligt at udføre laboratoriemålingerne med materialet fra det øvre sand, da materialet først blev udtaget sent i undersøgelsesforløbet /7/ og stammer fra skrå borer, der ikke kunne føres til det øvre sand af tekniske årsager /7/. De to sandlag (øvre og terrænnære) er dog meget ens jf. de geotekniske analyser i /7/. Målingerne på jordprøverne har i laboratoriet vist et lavt iltforbrug på ca. 0,025 g ilt /kg jord TS over 28 dage. Det ses, at iltforbruget i laboratoriet var jævnt stigende over forsøgets 30 dage svarende til et forbrug på ca. 0,0012 g O₂ /kg jord pr. dag.

Desuden er der i laboratoriet udført målinger af det biologiske iltforbrug i de udtagne jordprøver, dvs. iltforbruget ved tilsætning af bakterier (standardkultur for BOD5 analyse) over 5 dage (BOD5). Dette viste et iltforbrug på 0,043 g O₂/kg jord, eller 0,009 g O₂/kg jord pr. dag. Det højere iltforbrug er sandsynligvis pga. de tilsattes bakterie respiration ved denne metode. Detailprojektering udføres herefter på baggrund af det daglige iltforbrug på 0,009 g O₂/dag.

Strømningshastighed i det øvre sandmagasin er ca. 4,2 m/år eller 11,5 cm/dag (baseret på den målte hydrauliske ledningsevne på 1,6 x 10⁻⁵ m/s i boring B107 (se Tabel 2.1)), en porøsitet på 0,3 og den målte gradient på 0,0025 (se rospotentialet kort på Figur 2.5). Testfelterne er ca. 2 meter i strømningsretningen, hvorved opholdstiden i cellen vil kunne beregnes til ca. 6 måneder. Lag-fasen for bakterier er på ca. 3-4 uger, så det vurderes at være muligt at observere en gavnlig effekt af den tilsatte ilt.

I nedenstående Tabel 3.3 fremgår beregningerne for den nødvendige mængde ilt, som indgår i detailprojekteringen. Beregningerne viser, at der over 30 dage forventes at skulle tilsættes henholdsvis 3,9 kg ilt til testfelt 1 og 7,8 kg til testfelt 2. Dette opnås ved at anvende et større flow i testfelt 2.

	Felt 1	Felt 2	Enhed
Areal af testfeltet (A)	4	4	m ²
Tykkelse af sandmagasin (D)	2	4	m
Jordvolumen (V _{jord} =A*D)	8	16	m ³
Masse af jord (ρ=1.8) (M _{jord} =ρ*V _{jord})	14.400	28.800	kg
Porevolumen (ε=0,3) (P _v =ε*V _{jord})	2,4	4,8	m ³
Dagligt iltforbrug, baseret på BOD5 forsøg (BOD pr. dag)	0,009	0,009	g O ₂ /kg jord
Mængde af tilsat ilt pr. dag (M _{ilt, dag} = BOD pr. dag * M _{jord})	130	260	g O ₂ /dag
Mængde af tilsat ilt pr. felt pr. måned (Masse _{ilt30} = M _{ilt, dag} * 30 dage)	3,9	7,8	kg
Volumen af tilsat ilt over 30 dage v. P=2 bar ρ= 2,66 kg/m ³ , (Vol _{ilt} = Masse _{ilt30} / 2,66 kg/m ³)	1,46	2,92	m ³
% af porevolumen (Vol _{ilt} /P _v)	61	61	%

Boks 3, fortsat

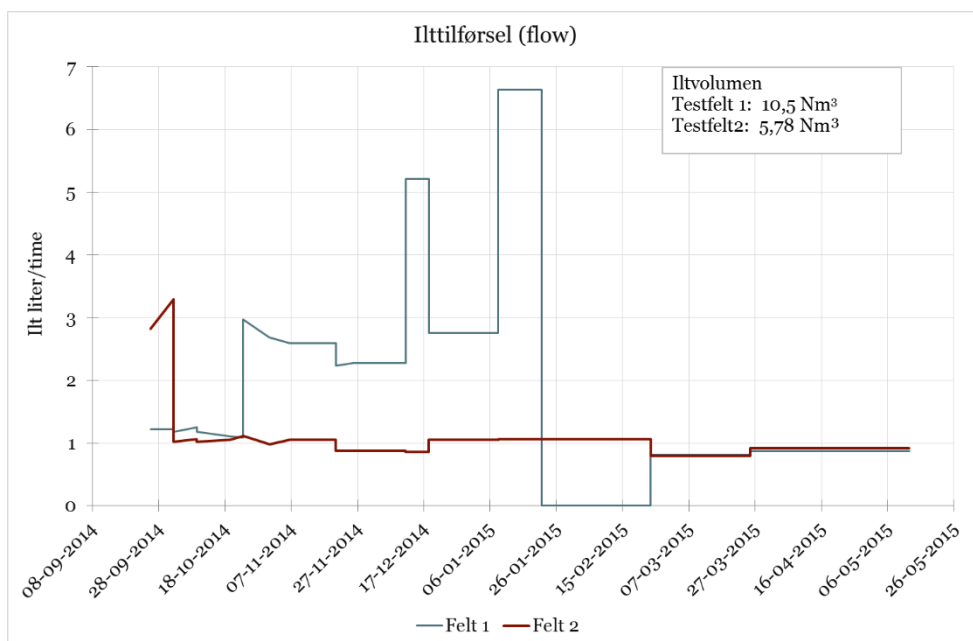
Desuden er det valgt at tilsætte ilt i ren form i stedet for atmosfærisk luft for at mindske det nødvendige gasvolumen og mindske fortrængning af vandet. Oprindeligt var det planlagt at tilsætning af ilt skulle vare ca. 30 dage, hvorefter forholdene vil være aerobe og dermed gunstige til bakterietilsætning. Den tilsatte mængde ilt over 30 dage ville svare til 61 % af den tilgængelige porevolumen (se Tabel 3.3). Jo mindre volumen man tilsætter, jo mindre er risikoen for at der sker en voldsom fortrængning af porevandet i testfeltet, som kan resultere i en variation af pesticidkoncentrationerne, der besværliggør skelnen mellem effekten af behandling og effekten af naturlig variation i filtrene. Det har tidligere været observeret kraftige variationer i bl.a. B101-1, hvor pesticidkoncentrationen mellem to prøvetagningsrunde (7 måneders mellemrum) har varieret mellem 3 og 149 µg/l /7/. Med baggrund i et ovenstående var det planlagt at ilttilførsel skulle foregå ved at tilsætte 130 g O₂ pr. dag i felt 1 (1,46 m³ pr. md) og 260 g O₂ pr. dag 1 (2,92 m³ pr. md) i felt 2 jf. Tabel 3.3. Det svarer til et flow på hhv. 2 og 4 liter pr. time.

Ved implementering af pilotforsøget, viste det sig dog nødvendigt at tilsætte ilt over en meget længere periode, hvilket medførte at en større volumen ilt blev tilsat. Der er i perioder anvendt et større flow op til 6 l/time (se også Figur 3.7).

Nedbrydningsraten (1. orden) for dichlorprop under aerobe forhold forventes at være i størrelsesordenen på 0,15 dag⁻¹ (se boks 1 i afsnit 1). Det kræver en nedbrydningstid på ca. 48 dage for at komme ned på under kvalitetskriteriet op 0,1 µg/l, hvis vi antager en startkoncentration på 149 µg/l, som observeret i B101 /7/ (Ckvalitetskriterie = Cstart * e^{-0,15*t}). Strømningshastighed i øvre sand er på 0,0115 m/dag (antaget en hydraulisk ledningsevne på 1,6 • 10⁻⁵ m/s samt en gradient på 0,025 og en porøsitet på 0,3 jf. /7/). Dvs. at længden af området, der skal holdes aerobt, er på ca. 0,5 meter ud fra en nedbrydningstid på 48 dage, hvilket vurderes at være muligt, da forsøgene er dimensioneret for at holde aerob et 2 m lang område.

Samtidigt er det vigtigt at dimensionere ilttilsætningen således, at den tilsatte gas kan opløses i vandet uden, at den fører til en fuldstændig fortrængning af vandet. Oprindeligt var der dimensioneret med en mindre ilttilførselsperiode svarende til ca. 30 dage med en tilførselsrate på 130 g O₂ pr. dag i felt 1 (1,46 m³ pr. md) og 260 g O₂ pr. dag 1 (2,92 m³ pr. md) i felt 2. Dimensionering havde taget udgangspunkt i en række beregninger, der var baseret på jordens forventede iltforbrug som beskrevet i boks 3.

Iltmængderne til de to felter er i løbet af projektet reguleret i forhold til den konstaterede iltmætning i monitoringsboringerne. Reguleringen af flowet er sket i forbindelse med feltarbejdet. Iltinjektionen er påbegyndt den 25. september 2014 og er afsluttet den 12. maj 2015. På Figur 3.7 er ilttilførselsen over forsøgsperioden vist for felt 1 og felt 2.



Figur 3.7 Ilttilførsel i felt 1 og felt 2 i forsøgsperioden

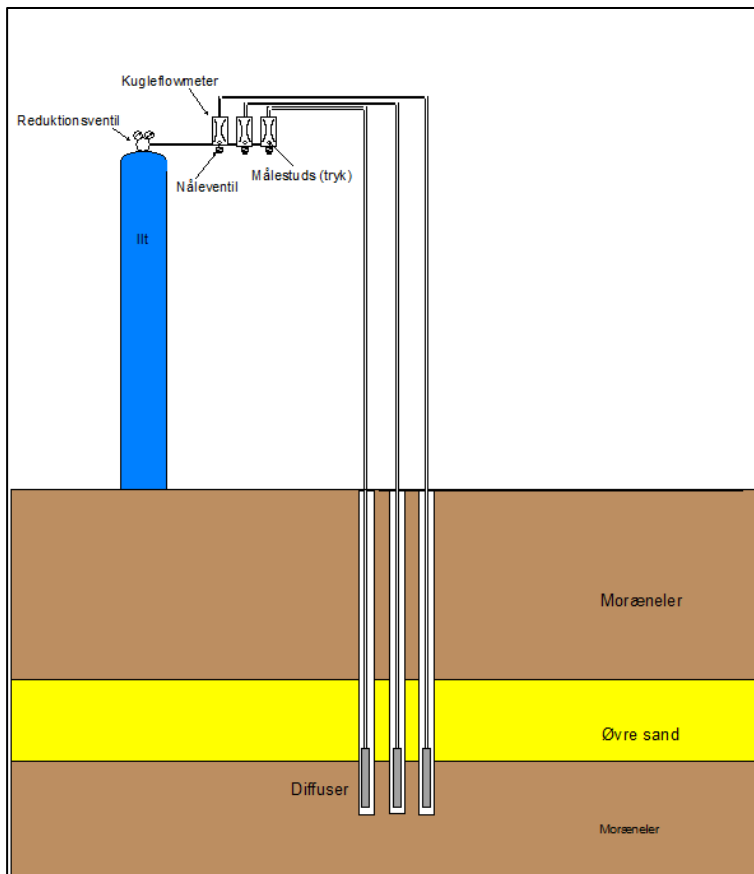
3.1.4.1 Etablering af injektionsanlæg

Ilt blev injiceret i det øvre sandmagasin gennem injektionsboringerne. For at sikre en stabil og præcis iltinjektion, blev der etableret et iltinjektionsanlæg bestående af to identiske systemer til henholdsvis felt 1 og felt 2. Iltinjektionsanlægget blev placeret i et aflåst præfabrikeret træskur. På nedenstående Figur 3.8 ses en principskitse af iltinjektionsanlægget.

Der blev opstillet 2 stk. 50 L standard gasflaske med komprimeret ilt (se Foto 3.3). Gasflasker er ved levering fyldt med komprimeret ilt og trykket i flaskerne er 200 gange større end atmosfærens tryk, dvs. 200 bar. Indholdet i en 50 L gasflaske svarer således til ca. 5 m³ ilt ved atmosfærisk tryk. Gasflaskerne er udskiftet i takt med, at ilt i flaskerne er forbrugt. Der blev i alt brugt ca. 21 m³ i monitoringsperioden ja. Figur 3.7. På hver iltflaske blev der monteret en reduktionsventil så afgangstrykket fra iltflaskerne kunne reduceres til 2 bar. Fra reduktionsventilen blev ilt via kobberrør ført frem til en manifold med 3 præcisions kugleflowmetre, hvor flowet til hver diffuser kunne reguleres ved hjælp af nåleventiler i intervallet 0,3 L til 2,8 L.

Efter flowmetrene blev der monteret en kugleventil, hvor trykket til den enkelte diffuser blev målt med en digital trykdifferensmåler. Fra hvert kugleflowmeter blev der etableret et 10 mm kobberrør ud til hver diffuser. Den præcise mængde ilt til hver diffuser er herefter beregnet ud fra følgende ligning:

$$Q_{Normal} = Q_{Aflæst} \cdot \sqrt{\frac{P}{1013} \cdot \frac{273}{273 + T}}$$



Figur 3.8 Principskitse af iltinjektionsanlæg



Foto 3.3 Iltinjektionsanlæg med iltflasker og manifold.

3.1.5 Injektion af mikroorganismer i testfelt 2

I testfelt 2 blev der tilsat specifikke nedbrydere for at evaluere effekten af bioaugmentering. Bakterierne *Sphingomonas herbidovorans* MH blev tilsat af to omgange efter, at der blev etableret aerobe forhold. Tilsætning er udført gennem borer B1 og B2 (se Figur 3.3). Valget af *Sphingomonas herbidovorans* MH til udsætning på det kontaminede site på Skelstofte,

blev truffet ud fra litteraturen, hvor dette bakterieisolat er forholdsmæssigt godt karakteriseret i en række videnskabelige publikationer /10,11/. *Sphingomonas herbicidovorans* MH kan producere enzymer, der muliggør aerob nedbrydning af flere typer phenoxysyrer, som bakterien sandsynligvis anvender som kulstofkilde.

Bakterierne er tilsat i væskeform. Kulturen har en karakteristisk gul farve som vist på Foto 3.4. Der er udført to tilsætninger af 3 L i en koncentration på 1011 celler pr. liter væske. Når denne mængde opblandes i porevolumen vil det svare til en koncentration på omkring 107 celler pr. liter, som forventes at være tilstrækkelig til at opnå en nedbrydningsdygtig biomasse med baggrund i Aarhus Universitets tidligere erfaringer i laboratorieforsøg. Ved den første tilsætning af bakterier blev der samtidigt etableret recirkulering på tværs af strømningsretningen. Recirkuleringen er etableret ved op-pumpning af vand fra boring B1 med et flow på 1 L/min. Det oppumpende vand blev ledt ned i boring B2. På denne måde blev der skabt en bevægelse i det volumen vand, der var langs cellens bredde mellem B1 og B2. Når recirkulering blev stoppet efter et par dage, antages bakterierne fordelt over hele bredden.



Foto 3.4 Flaske med *Sphingomonas herbicidovorans* MH, klar til at blive tilført jorden i 9 meters dybde på Skelstofto d. 5.2.2015.

Injektion af mikroorganismer er udført to gange d. 11. december 2014 og d. 5. februar 2015. Detaljer om valg og produktionen af inokulum er beskrevet i Bilag B. Ved begge tilførsler blev inokulatet kvalitetskontrolleret ved at køre et overnats potentielt mineraliseringsassay på 0,1 ml af inokulum. Dette check mislykkes ved første tilførsel (19.12.2014), fordi flasken væltede, så der trængte NaOH ud i kulturen, hvilket ødelagde den øjeblikkeligt. For at fjerne enhver tvivl om kvaliteten af inokulum, blev der derfor gennemført endnu en *Sphingomonas herbicidovorans* MH tilførsel (3.2.2015) på lokaliteten. Her viste kvalitetstjekket, at inokulumskulturen mineraliserede ca. 8 % af det tilgængelige 14C-DCP i et overnatsassay, hvilket betyder at kulturen bestod af det rette bakterieisolat, der også var i stand til at nedbryde dichlorprop helt til CO₂.

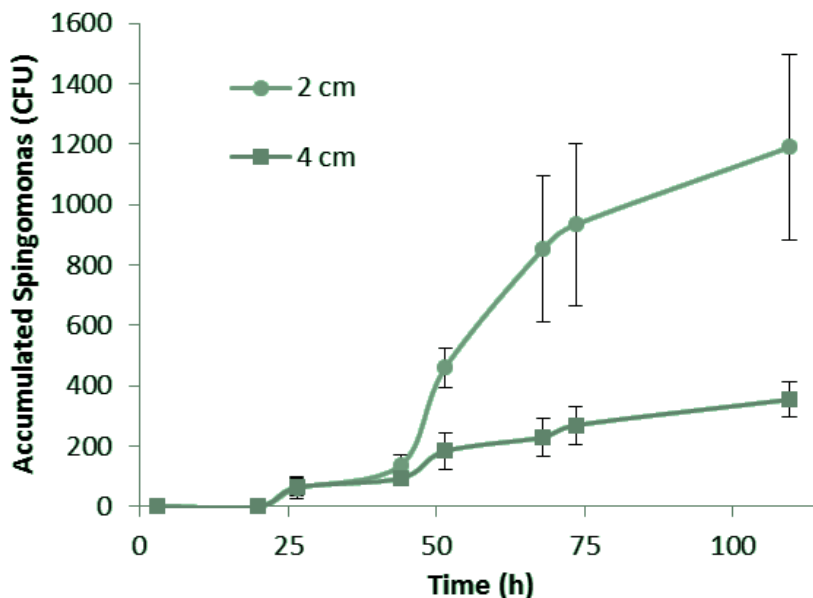
Overlevelsen og mulig udbredelse af den tilførte *Sphingomonas herbicidovorans* MH blev fulgt ved tage vandprøver i alle monitoreringsboringer samt i de to boringer, hvor den blev tilført. Det totale antal dyrkbare bakterier (CFU) blev estimeret efter spredning af passende fortyndinger af vandprøverne (i 1L PBS (Phosphate Buffer saline) væske på to forskellige vækstmedier (R2A Agar) og TSA (Trypticase™ soy agar), som er ideelle til bestemmelse af dyrkbare bakterier.

3.1.6 Transportforsøg i kolonneopsætning

For at forhåndsvurdere om *S. herbicidovorans* MH kunne forventes at transporteres i jorden, blev der udført en række kolonneforsøg i laboratoriet. Som kolonnematrice blev der anvendt materiale udtaget fra Skelstofto i forbindelse med etablering af boringer til det senere in situ forsøg. En detaljeret beskrivelse af disse forsøg kan læses i Bilag B. Vandbevægelsen i sandet på Skelstofto er estimeret til ~5 cm i døgnet og der blev derfor dagligt tilført vandværksvand til toppen af kolonnerne i en mængde svarende hertil. Kolonnerne blev overdækket og perkoleret vand blev opsamlet i sterile rør, hvorfra der blev udtaget prøver til tælling af dyrkbare bakterier (CFU, 0,1 TSB, N=3).

Resultaterne fra kolonneforsøgene viste, at et vist antal *S. herbicidovorans* MH overlevede og blev transporteret gennem kolonnerne. I Figur 3.9 fremgår det, at *S. herbicidovorans* begynder at bryde igennem kolonnen ca. 2 døgn efter tilførsel af kolonnen. Det akkumulerede antal af gennem-perkolerede *S. herbicidovorans* udgør henholdsvis 11 og 3 % af det oprindeligt antal

tilførte celler på 2 og 4 cm kolonnerne. Da kun 3% af nedbryder-isolatet blev transporteret over 4 cm i løbet af 5 d, forventes kun en begrænset spredning til de nærmeste monitoreringsboringer, i det senere feltforsøg. Det kan dog stadig være yderst meningsfuldt at tilføre nedbryderorganismer, fordi den forurenede vandfase så vil passere gennem et jordvolumen med en relativt tæt population af nedbrydere. Udpladning af sand fra den midterste del af kolonnerne viste, at en stor del af cellerne blev siddende her og stadig var i live.



Figur 3.9 Akkumuleret transport af *Spingomonas herbicidovorans* MH gennem jordkolonner med 2 og 4 cm tykkelse. Værdierne viser gennemsnitsværdier (N=3), bars indikerer SEM.

3.2 Monitoringsprogram

I løbet af hele forsøgsperioden blev der udført en række monitoringsaktiviteter for at belyse forløbet og effekten af iltning. Der blev målt for en række parametre i alle monitoringsboringer. Hyppighed for monitoringen af hver parameter kan ses i Tabel 3.4.

Formålet med monitoringen var:

1. At overvåge koncentrationen af opløst ilt, og dermed sikre der var etableret aerobe forhold
2. At måle for indhold af pesticider i grundvandet og dermed dokumentere effekten af behandlingen overfor forureningen
3. At måle for specifikke mikrobielle nedbrydere/gener for at vurdere effekten af ilttilsætning og evt. bakterietilsætning på den mikrobielle nedbrydning af dichlorprop samt karakterisere det naturlige mikrobielle samfund på feltlokaliteten. Denne aktivitet foretages af Aarhus Universitet.

På grund af felternes begrænsede størrelse og dermed den tætte interne placering mellem boringerne er der udført en "skånsom" prøveudtagning med mindst mulig forstyrrelse af de hydrauliske forhold. Der er anvendt en peristaltiske pumpe til oppumpning af vand. Forpumpning og prøvetagning forgik med en lav ydelse på 0,2 L/min indtil der blev opnået stabile værdier for O₂, pH, ledningsevne, °C, redox. Typisk var dette opnået efter 2-4 L. Herefter blev der udtaget vandprøver (ca. 2 L). Til bestemmelse af bakterier blev der udtaget 10 L. Dvs. at der i felt 1 ved hver vandprøvetagning blev udtaget 24-64 L vand, svarende til 1-2,5% af porevolumen, mens der i felt 2 blev udtaget en vandmængde svarende til 0,8-2% af porevolumen. Det

vurderes derfor at prøvetagningen ikke har haft noget væsentlig påvirkning på strømningssmønstre i testfelterne.

Baggrunds-målinger		iltning og monitorering									
9/10-09-2014	25-09-2014	02-10-2014 6-11-2014	13-11-2014	20-11-2014	11-12-2014	19-12-2014	08-01-2015	05-02-2015	23-02-2015	25-03-2015	12-05-2015
før borearbejde	0	7	49	56	77	85	105	133	151	181	229
x	x	5x	x	x		x	x				
x			x			x	x		x	x	x
x										x	
x			x			x	x		x	x	x

Baggrunds-målinger		iltning og monitorering									
9/10-09-2014	25-09-2014	02-10-2014 6-11-2014	13-11-2014	20-11-2014	11-12-2014	19-12-2014	08-01-2015	05-02-2015	23-02-2015	25-03-2015	12-05-2015
-30	0	7	49	56	77	85	105	133	151	181	229
x	x	5x	x	x		x	x				
x			x			x	x		x	x	x
x										x	
x			x			x	x		x	x	x

Tabel 3.4 Oversigt over monitoringsprogrammet

3.2.1 Monitorering af ilt

Koncentrationen af opløst ilt i vandet blev overvåget i alle filtre i testfelterne jf. monitoringsprogrammet i Tabel 3.4. Iltkoncentrationen blev målt dels ved feltmålinger og dels med 2 iltensorer, der har logget iltkoncentrationerne kontinuert med et minut interval.

I starten af iltningensperiode (de første 2-3 dage) blev der kontinuert udført monitorering af ilt i borer M1 og M4-2 med optiske iltensorer (LDO SC online fra Hach Lange), fordi det forventedes at se en hurtigere respons i disse. I de øvrige monitoringsfiltre blev koncentrationen målt manuelt ca. en gang i timen ved brug af en almindelig iltelektrode.

Derefter er der fortsat udført kontinuert måling af ilt i M1 og M4-2. Der var fjernadgang til data fra sensorerne således, at koncentrationen af ilt i de udvalgte filtre kunne overvåges konstant. I de øvrige filtre blev de manuelle målinger foretaget jf. monitoringsprogrammet i Tabel 3.4.

Feltmålinger af iltkoncentrationer blev udført på følgende måde ved de 12 monitoringsrunder, hvor der er målt ilt. Med et flow på 0,2 l/min er der ved hjælp af en peristaltisk pumpe oppumpet 3 L vand fra hvert filter. Opsætning for feltmålingerne kan ses på Foto 3.5.

Derudover er der i marts 2015 udført supplerende målinger af iltindhold for at belyse variationen af iltindholdet over sandmagasinets dybde. Der er installeret 4 stk. Ø25 PEH slanger i alle filtre i monitoringsboringerne med en afstand af ca. 25 cm. Derefter er der manuelt målt for iltindhold i vandet.



Foto 3.5 Opsætning af feltmåling af ilt

3.2.2 Monitering af pesticider

Til monitering af pesticidkoncentrationer blev der løbende udtaget vandprøver fra samtlige moniteringsfiltre i begge testfelter som vist på Tabel 3.4. I området har tidligere undersøgelser vist større variationer i pesticidindholdet, hvorfor det var vigtigt at monitere på alle filtre i testfelterne i det øvre sandlag for at danne sig et billede af forureningens udvikling. Udover phenoxysyrer og deres nedbrydningsprodukter er andre pesticider inkluderet i analysepakken som vist på nedenstående tabel.

Pesticider i vandpakke 1	2,4-D, 2,6-dichlorbenzamid (BAM), 2-CPP*, 4-CPP, 4-nitrophenol, Atrazin, Bentazon, Desethylatrazin, Desethylterbutylazin, Desisopropylatrazin, Dichlorprop, Dinoseb, Hexazinon, Hydroxyatrazin, Isoproturon, MCPA, Me-chlorprop, Simazin, Terbutylazin, Metribuzin-desamino-diketo, Metribuzin-diketo, 4-chlor-2-methylphenol, 2,4-dichlorphenol, 2,6-dichlorphenol
---------------------------------	---

*2-CPP udgik af analysepakken i marts 2014

Tabel 3.5 Pesticider i moniteringsprogrammet

3.2.3 Monitering af øvrige redoxparametre

Tilsætning af ilt påvirker redoxforholdene. Desuden er de biologiske nedbrydningsprocesser redox-sensitive, hvorfor disse parametre også er målt gennem forsøgsperioden.

3.2.4 Monitering af mikrobiologiske parametre.

Sideløbende med vandprøvetagning blev der foretaget monitering af mikrobiologiske parametre i alle moniterings filtrene i begge testfelter. Prøverne er udtaget enten af Aarhus Universitet (AU) eller Orbicon i emballage forberedt og leveret af AU. Følgende mikrobiologiske parametre blev målt i de udtagne vandprøver:

- CFU (colony forming units) af dyrkbare bakterier generelt samt CFU for *Spingomonas herbivorans* MH, som er det isolat der injicerer i Felt 2.
- Tælling af den mikrobielle aktivitet og mineraliseringsraten (raten for omdannelse af dichlorprop til CO₂) ved laboratorieforsøg med prøver fra begge felter og 14C mærket dichlorprop.
- 16 sekventering til bestemmelse af taksonomiske enheder og analyse af den naturlige forekommende bakterielle diversitet.

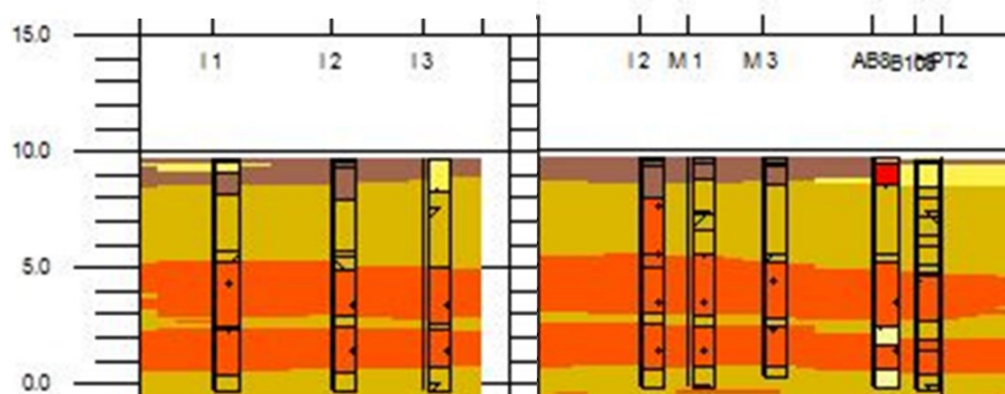
4. Resultater fra pilotforsøget

4.1 Geologi og hydrogeologi

På baggrund af de nyetablerede injektions og monitoringsboringer er den overordnede geologiske forståelse for lokaliteten opdateret i de to testfelter.

Testfelt 1

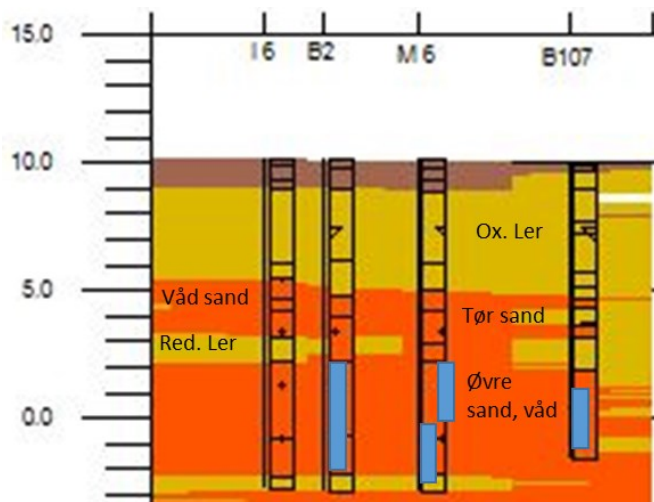
Boringer I1-II3, M1-M3 og B108 viste, at geologien inden for testfelt 1 er ensartet og består af ca. 4 m oxideret ler, efterfulgt af 3 m oxideret leret sand til ca. 7 m u.t. hvor der træffes et tyndt lag af reduceret moræneler på ca. 0,25 m. Derefter træffes det øvre sandmagasin bestående af reduceret sand til ca. 9 m u.t. efterfulgt af ler (som vist på Figur 4.1). Boringerne er filtersat i det øvre sandmagasin i 7-9 m u.t.



Figur 4.1 Geologiske profiler for testfelt 1

Testfelt 2

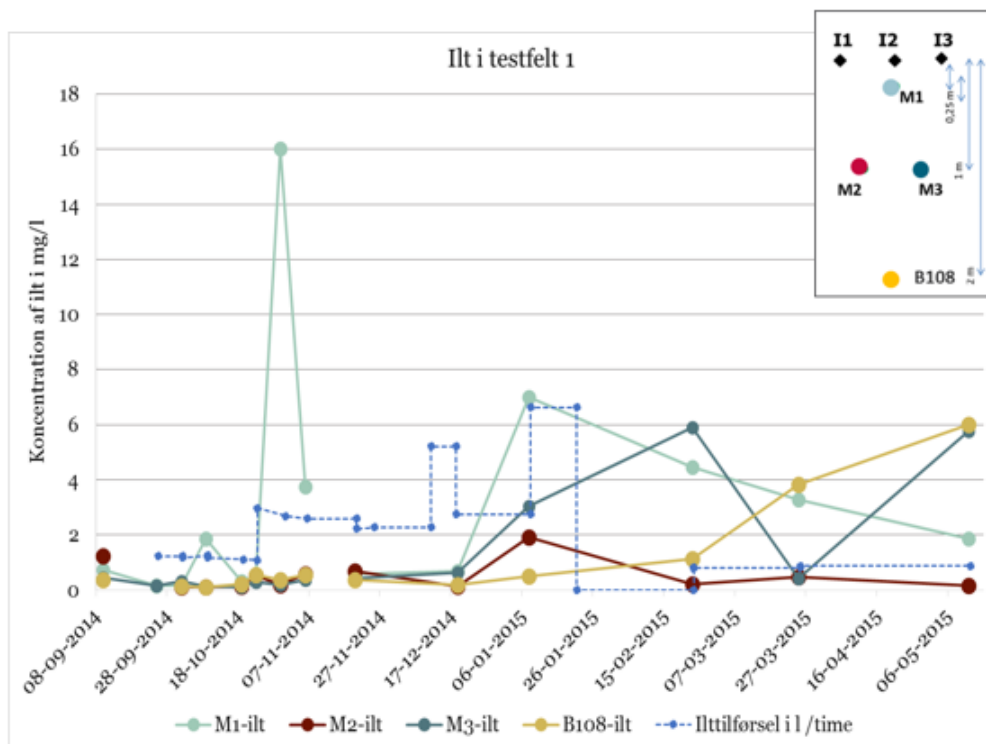
Boringer I4-I6, M4-M6, B1-2 og B107 viste, at geologien inden for testfelt 2 er væsentligt forskellig fra testfelt 1, og desuden mindre ensartet indenfor testfeltet. De udførte borer viste, at der under et tyndt fyldlag optræder ca. 4 m moræneler. Derefter træffes der oxideret sand med indslag af grus og silt til ca. 11 m u.t. I borerne B1, M4 og I6 træffes der et tyndt lag af moræneler i ca. 7-8 m dybde. I disse borer er det overliggende sandlag fra 6-7 m u.t. våd, mens der i de øvrige borer først træffes vand i ca. 8 m u.t. Fra ca. 11 m u.t. skifter sandet karakter til en finere grå sand til ca. 12,5 m u.t., hvor moræneler træffes. Monitoringsboringerne er filtersat i to niveauer i sandmagasinet fra ca. 8 til 10 m u.t. og fra 10-12 m u.t. borerne til bakterietilsætning blev filtersat over hele dybden (8-12 m u.t.). Figuren illustrer den stor heterogenitet i geologien, idet da i boring, B107, træffes et lerlag omkring 6 og 8 m u.t. som ikke træffes i boring M6 og B2. Ilt, bakterietilsætning og monitoring er foregået i det "øvre sand" som er en gennemgående lag i alle borer.



Figur 4.2 Geologisk profil testfelt 2 der illustrerer den varierende geologi

4.2 Iltspredning og redoxforhold

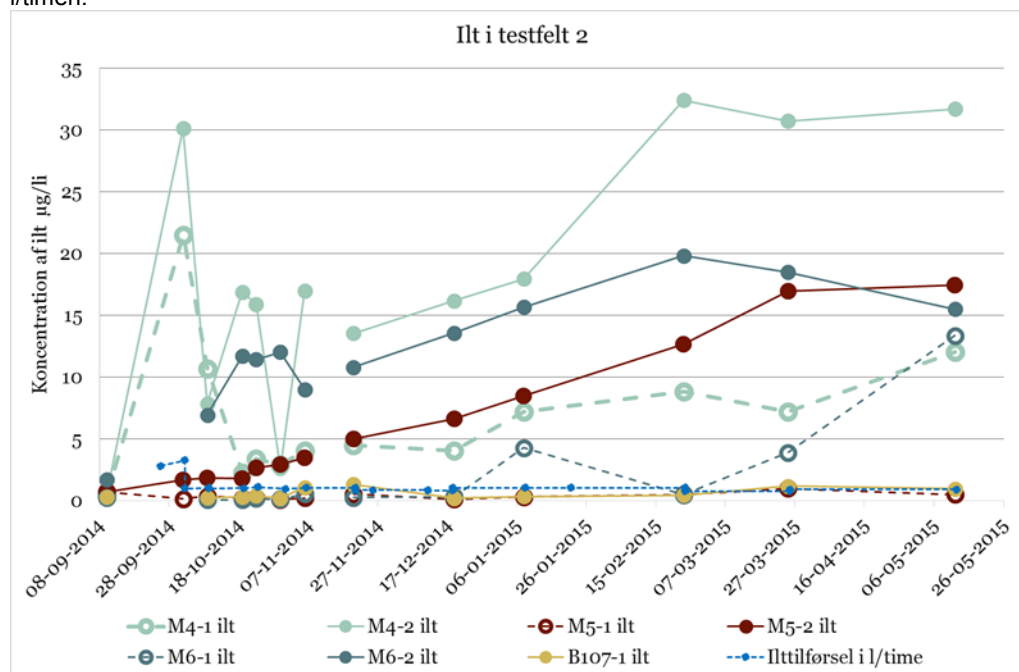
Koncentrationen af ilt i grundvandet blev målt igennem hele forsøget jf. afsnit 3.2. Resultaterne for målingerne i testfelt 1 ses på Figur 4.3. Generelt har iltkoncentrationen i monitoringsboringerne i testfeltet været meget lav på trods af, at ilttilførsel er øget løbende. Kun i monitoringsboring M1 (tættest på injektionsboringerne) ses der forhøjede ilt-niveauer kort efter start af ilttilførsel. Når iltflowet blev øget til ca. 6 l/time ses der gennembrud af ilt i de øvrige boringer i januar 2015, dvs. 3,5 måneder efter opstarten af ilttilførsel. Derefter er der generelt observeret iltede forhold ($> 1 \text{ mg/l O}_2$) i boringer M1, B108 og til dels M3, mens der ses lavere koncentrationer i M2 og M3, til trods for at boring B108 ligger længst væk fra iltinjektionsboringerne. Disse resultater tyder på, at der sker en præferentiel spredning af iltten i retning mod M3, hvilket kan skyldes, at strømningsretningen i det øvre sandlag har været mere sydlige end oprindeligt antaget.



Figur 4.3 Koncentrationen af ILT (mg/l) i boringer i testfelt 1 i løbet af forsøget. Ilttilførsel er også angivet med den blå stiplede linje i l/time

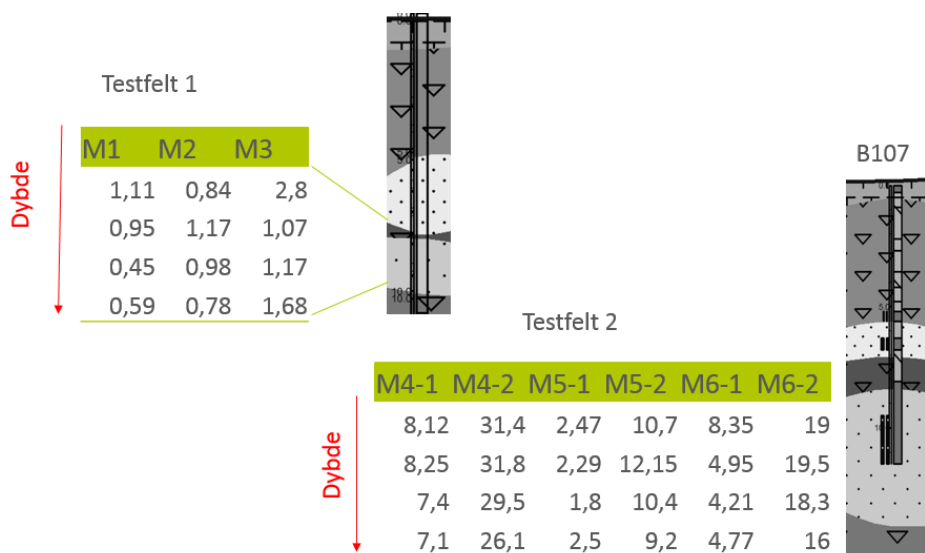
I testfelt 2 ses der meget høje iltkoncentrationer (>10 mg/l) i monitoringsboringen M4 (tættest på injektionsboringerne) umiddelbart efter injektionen (se Figur 4.4). Generelt ses der igennem hele forsøgsperioden en høj koncentration af ilt i alle de øvre filtre M4-2, M5-2 og M6-2, mens der ses et mere forsinket gennembrud i de dybe monitoringsfiltre (eks. M6-1), først 3,5 måneder efter ilttilførselsens opstart. Ved forsøgsperiodens afslutning ses der iltkoncentrationer over 5 mg/L i alle monitoringsfiltre med undtagelsen af B107-1 og M5-1. I B107-1 ses der gennembrud af ilt i januar 2015. Men koncentrationen falder igen under 1 mg/L i en periode, for igen at overstige 1 mg/l i marts 2015.

Lignende mønster ses i M5-1, hvilket igen tyder på en mere sydlig strømningsretning end oprindeligt antaget. I testfelt 2 har ilttilførsel været stabil over hele perioden med en flow på 1 l/timen.



Figur 4.4 Koncentrationen af ilt (mg/l) i borerne i testfelt 1 i løbet af forsøget. Ilttilførsel er også angivet med den blå stiplede linje i l/time

Der er udført en række målinger over dybden for at belyse den vertikale iltspredning i de to testfelter. Som vist i Figur 4.5, er der faldende iltkoncentrationer langs filterdybden i stor set alle monitoringsfiltre. I testfelt 1 er koncentrationsforskellen langs dybden ikke særlig stor. Således vurderes det, at der har været en nogenlunde homogen spredning af ilten i testfelt 1, som dog har resulteret i lave koncentrationer. Det er muligt, at ilten har spredt sig udenfor testfeltet. I testfelt 2 er der større koncentrationsforskelle langs dybden, men det skyldes, at sandmagasinet i felt 2 er meget tykkere (ca. 4 m).



Figur 4.5 Ilt koncentration over dybde i B108 og B107

Dato	Boring	pH	Ilt mg/l	ilt felt	NVOC mg/l	Jern, filt.	Man- gan, filt. Mg/l	Nitrat mg/l	Sulfat mg/l
TESTFELT 1									
før iltning									
10-sep-14	M1	7,50	0,3	0,74	5,1	1,4	0,05	0,64	450
10-sep-14	M2	7,40	0,2	1,24	11	2,3	0,094	<0,1	130
10-sep-14	M3	7,30	0,5	0,46	1,6	0,17	0,1	220	84
10-sep-14	B108	7,30	0,6	0,37	1,4	0,013	0,07	150	69
Efter iltning									
25-mar-15	M1	7,50	3,3	3,29	2,2	0,0033	0,08	150	210
25-mar-15	M2	7,50	<0,2	0,47	2,2	2,7	0,09	2,9	280
25-mar-15	M3	7,20	0,72	0,42	1,1	0,0049	0,037	190	92
25-mar-15	B108	8,00	1,6	3,82	1,2	0,011	0,05	130	81
TESTFELT 2									
før iltning									
10-sep-14	M4-1	7,30	0,2	0,45	1,9	0,027	0,16	41	85
10-sep-14	M4-2	7,20	0,4	0,51	1,5	0,015	0,2	110	65
10-sep-14	M5-1	7,30	0,3	0,73	1,7	0,29	0,19	59	140
10-sep-14	M5-2	7,30	0,6	0,73	1,6	0,015	0,22	64	44
10-sep-14	M6-1	7,30	0,8	0,28	2,3	0,56	0,2	1,2	250
10-sep-14	M6-2	7,30	1,9	1,75	1,3	0,0081	0,13	84	47
10-sep-14	B107-1	7,20	0,5	0,3	1,5	0,0012	0,089	100	120
Efter iltning									
25-mar-15	M4-1	7,50	9,3	7,22	5,4	0,0075	0,0045	24	130
25-mar-15	M4-2	7,30	>10	30,71	1,1	0,0036	0,0011	52	67
25-mar-15	M5-1	7,20	0,71	1	2,2	0,039	0,075	30	120
25-mar-15	M5-2	7,30	>10	16,7	1,2	0,0017	0,0011	58	41
25-mar-15	M6-1	7,70	3,2	3,93	1,7	0,0036	0,029	38	160
25-mar-15	M6-2	7,40	>10	18,5	1,1	0,002	0,0008	59	45
25-mar-15	B107-1	7,30	1,9	1,2	1,5	0,0063	0,019	45	99

Tabel 4.1 Resultater for redoxparametre i de to testfelter

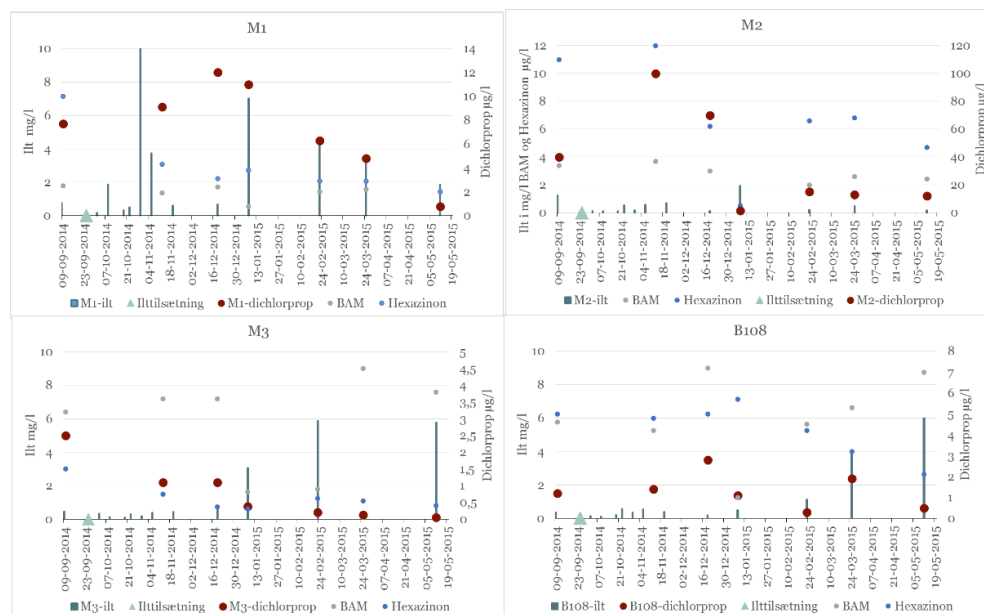
4.3 Pesticidkoncentrationer

4.3.1 Udvikling i pesticidkoncentration ved iltning alene (biostimulering) (test-felt 1)

Der er udtaget vandprøver til analyse for pesticider igennem hele pilotforsøget jf. monitoringsprogrammet i afsnit 3.2. På Figur 4.6 ses udviklingen i koncentrationen af dichlorprop i alle monitoringsboringer i testfelt 1. Der er desuden analyseret for de øvrige phenoxysyrer samt nedbrydningsprodukter heraf såsom 2-CPP, 4-CPP, og dichlorophenolerne. Desværre er 2-CPP udgået fra laboratoriets analyseprogram ca. halvvejs i forsøgsperioden. Data kan ses i Bilag D. Generelt ses der ikke forhøjede niveauer af metabolitter 4-CPP eller dichlorophenoler, som kunne være evidens for nedbrydning. Det skal dog bemærkes at metabolitterne også vil være nedbrydelige under oxiderede forhold.

Idet der på lokaliteten ses en stor naturlig variation i pesticidkoncentrationer over tid, er data for BAM og hexazinon taget med til sammenligning. Disse stoffer forventes at være mindre påvirket af aerob nedbrydning. I boring M1, hvor iltniveauet har været stabilt højt siden januar 2015, ses der et tydelig fald i koncentration af dichlorprop over tid, som dog først starter omkring februar 2015, mens koncentrationen af BAM og hexazinon er nogenlunde stabile.

I boring M2 har iltniveauet været meget lavt. Her ses der en stor variation i koncentrationen af dichlorprop, fra ca. 40 µg/l inden forsøgets start og op til 100 µg/l derefter. I forbindelse med, at der sker gennembrud af ilt i boringen ses der et kraftigt fald i koncentrationen af dichlorprop til 1,5 µg/l. Ved forsøgets slutning er koncentrationen af dichlorprop i boringen på omkring 15 µg/l og iltniveauet er på ca. 0,2 mg/l. Til sammenligning ses der et stabilt indhold af BAM på ca. 3 µg/l og hexazinon på 5-12 µg/l.



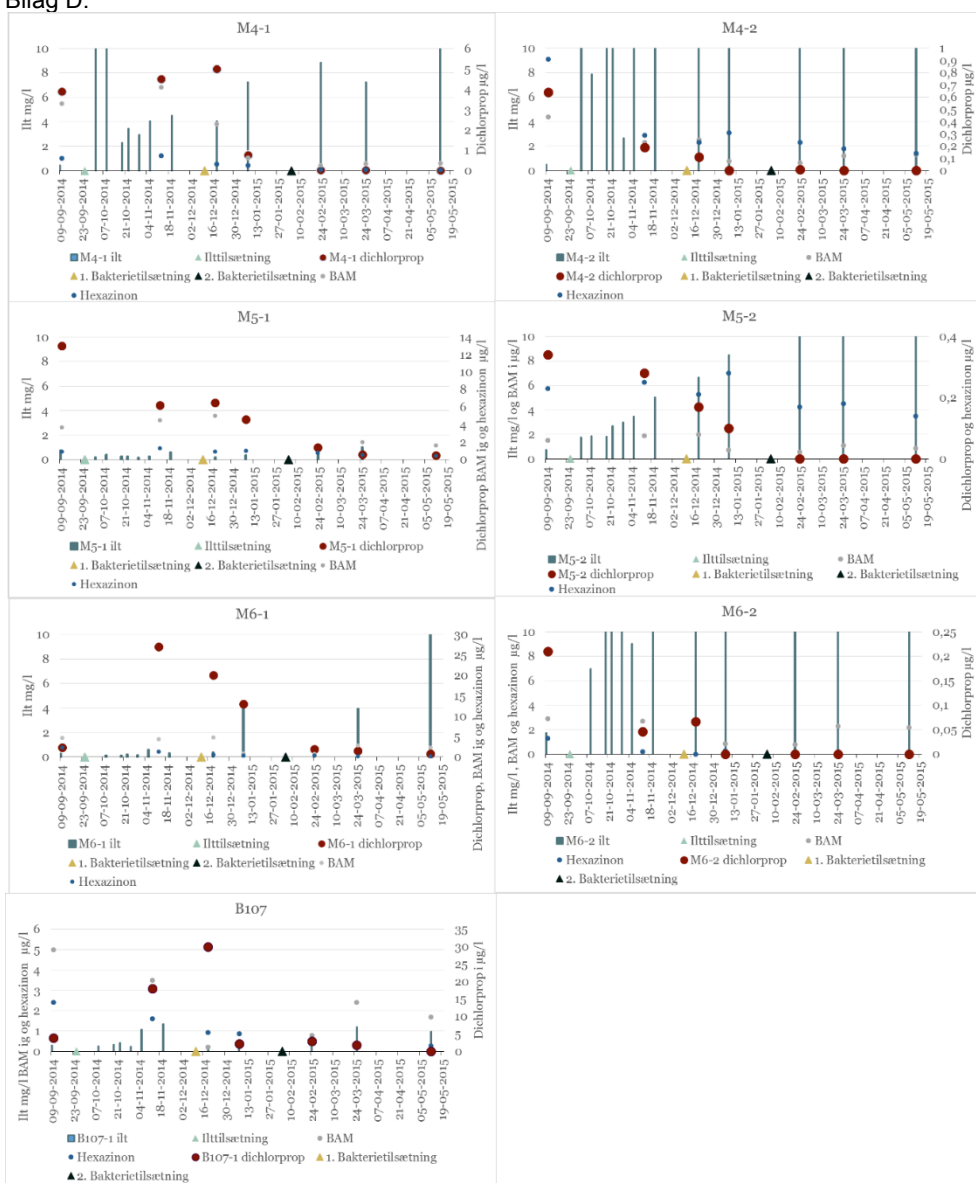
Figur 4.6 Udvikling i pesticidkoncentrationer i felt 1. Der er kun vist data for DICHLORPROP, BAM, hexazinon. Figuren findes i større format i Bilag E

I boring M3 falder dichlorprop koncentrationen fra ca. 1 µg/l til 0,4 µg/l ved iltgennembrudet i januar 2015. Iltniveauet forbliver højt og koncentrationen af dichlorprop er ved forsøgets afslutning på 0,053 µg/l. Til sammenligning er BAM koncentrationen nogenlunde stabil (ca. 4 µg/l), mens indholdet af hexazinon viser et mindre fald. I boring B108 ses der et meget forsinket gennembrud af ilt, hvor niveauet først overstiger 1 mg/l i marts 2015. Indholdet af dichlorprop varierer mellem 0,5 og 2,8 µg/l. Der ses dog et fald ved forsøgets slutning fra 1,9 µg/l i marts 2015 til 0,5 µg/l 2 måneder senere, men det kan være et resultat af den naturlige variation. Generelt ses indholdet af BAM og hexazinon at være stabil.

Resultaterne viser, at der i næsten alle monitoringsboringer er sket et fald i koncentrationen af dichlorprop i forbindelse med, at forholdene er blevet aerobe. Dog kan et fald i koncentrationen ikke alene ses som bevis på nedbrydning, hvorfor der også er udført en række mikrobielle analyser for at styrke bevisgrundlaget for nedbrydning med flere lines of evidence (se afsnit 4.4). I modsætning til dichlorprop er indholdet af BAM og hexazinon nogenlunde stabil i de fleste boringer. Det er muligt at dichlorprop er nedbrudt til andre metabolitter som resultat af ilttilførslen. Dog er der ikke set forhøjede koncentrationer af kendte metabolitter (dichlorophenoler og 4-CPP). Der er ikke målt for 2-CPP.

4.3.2 Udvikling i pesticidkoncentrationer ved iltning og bioaugmentering i test-felt 2

Der er udtaget vandprøver til analyse for pesticider igennem hele pilotforsøget jf. monitoringsprogrammet i afsnit 3.2. På Figur 4.7 ses udvikling i koncentrationen af dichlorprop i alle monitoringsboringer i testfelt 2. Der er desuden analyseret for de øvrige phenoxysyrer samt nedbrydningsprodukter heraf (såsom 2-CPP, 4-CPP, og dichlorophenolerne). Data kan ses i Bilag D.



Figur 4.7 Udvikling i koncentrationen af Ilt, Dichlorprop, BAM og Hexazinon i testfelt 2 ved iltning og bioaugmentering. Figuren findes i større format i Bilag E

I boring M4, som ligger tættest iltinjektionsboringer, ses der et højt indhold af ilt umiddelbart efter starten af ilttilførsel. I det nedre filter M4-1 observeres der et fald i koncentrationen af dichlorprop fra ca. 5 til 0,78 µg/l ca. 1 måned efter bioaugmentering. Koncentrationen falder yderligere efter 2. runde af bioaugmentering og er forsat lav (<0,1 µg/l) ved forsøgets afslutning. En lignende udvikling ses der for koncentration af BAM og hexazinon denne boring. Det er svært dermed at konkludere om udvikling skyldes bioaugmentering eller ikke. Det kan ikke udelukkes, at de tilsatte bakterier ville kunne nedbryde andre pesticider, såsom BAM og hexazinon.

I samme borings øvre filter M4-2 ses der meget høje iltkoncentrationer >10 mg/l. Startkoncentrationen af dichlorprop i dette filter var meget lav (0,7 µg/l). Selvom der ses et fald i koncentrationen efter iltning og yderligere fald efter de to bakterietilførsel, er det svært at uddrage en konklusion om, at der sker nedbrydning pga. det meget lave startniveau. I denne boring ses der ligeledes faldende koncentrationer af de øvrige pesticider.

I boring M5-1 har iltniveauet været lavt <1 mg/l. På trods af dette, ses der et fald i koncentrationen af dichlorprop fra omkring 13 µg/l ved forsøgets start til ca. 0,5 µg/l. Dette fald kan ikke umiddelbart forklares. Observationer fra de øvrige pesticider viser et mindre fald i koncentrationerne af BAM og hexazinon. Boring M5 er også filtersat i det øvre del af magasinet (filter M5-2). Her ses en høj iltkoncentration og, som i lighed med M4-2, er startkoncentrationen af dichlorprop kun på 0,4 µg/l. Dichlorprop koncentrationen falder allerede ved iltning af ilt for derefter at falde til under detektionsgrænsen <0,01 µg/l efter bakterietilsætning. For de andre to pesticider, BAM og hexazinon, ses der kun et meget mindre fald i koncentrationerne, hvilket kunne styrke hypotesen om at fjernelse af dichlorprop skyldes nedbrydning.

I boring M6-1, filtersat i det nedre del af magasinet, ses der et meget varierende niveau af dichlorprop. Baselinemålinger ved opstarten viser et indhold af dichlorprop på blot 2,1 µg/l, som dog stiger til 27 µg/l i november 2014. I samme tidsinterval er koncentrationen af BAM nogenlunde stabil på ca. 4,5 µg/l. En mulig forklaring kunne være, at iltning resulterer i frigivelse af dichlorprop fra jorden eller tidligere "immobil" porevand, som bliver forstyrret ved iltningen. Koncentrationen af dichlorprop falder til ca. 15 µg/l efter 1. bakterietilførsel samtidigt med, at der observeres iltgennembrud i filtret, for derefter at falde til 1,9 µg/l efter den 2. bakterietilsætning. Udvikling i koncentrationen af BAM viser et mere beskedent koncentrationsfald, mens hexazinon-koncentrationen viser et kraftigere fald fra 2,3 til 0,15 µg/l

I lighed med de øvrige filtre i det øvre del af sandmagasinet, viser boring M6-2 et meget lavt startniveau af dichlorprop med startkoncentrationen på ca. 0,25 µg/l. Til gengæld ses der en høj iltkoncentrationer umiddelbart efter ilttilførslen. Koncentrationen af dichlorprop falder markant allerede efter iltning for derefter at falde til under detektionsgrænsen <0,01 µg/l efter bakterietilsætning. For de andre to pesticider, især for BAM, ses der et meget mindre fald i koncentrationerne, hvilket kunne styrke hypotesen om, at fjernelse af dichlorprop skyldes nedbrydning.

I boring B107, som er beliggende længst væk fra injektionsboringerne, ses der en udvikling i koncentrationen af dichlorprop, der ligner M6-1, med ca. 1 måneds forsinkelse. Koncentrationen af dichlorprop starter på ca. 3,9 µg/l, for så at stige til 18 µg/l og senere ca. 30 µg/l samtidigt med, at der i boringen ses et forhøjet iltkoncentration >1 mg/l. Koncentrationen af dichlorprop falder igen til ca. 2 µg/l efter 1. bakterietilførsel og yderligere til 0,11 µg/l. For BAM og hexazinon ses der ingen stigning i starten af forsøgsperioden. Koncentrationen af BAM falder samtidigt med dichlorprop koncentrationen er på sit højeste, for derefter at stige igen til halvdelen af baseline niveauet. For hexazinon ses en stabilt faldende udvikling. Forskellen i koncentrationstendensen mellem dichlorprop og BAM kan tyde på, at de varierende niveauer af dichlorprop skyldes tilstrømning af mere eller mindre forurenede grundvand til filteret snarere end nedbrydning.

Generelt set, ses der i felt 2 et kraftigere fald i koncentrationen af dichlorprop efter tilførsel af bakterier. Dette indikerer at bakterierne bidrager til nedbrydningen.

På trods af, at der på lokaliteten er udført en omfattende monitoring af pesticidkoncentrationerne, er det svært at uddrage præcise konklusioner om, hvorvidt der forekommer nedbrydning alene på baggrund af de faldende dichlorprop koncentrationer. Tolkning af resultater kompliceres af flere faktorer:

- Der er en naturlige variation i koncentrationen af pesticider, især dichlorprop. De højeste baggrundkoncentrationer af dichlorprop ses i de nedre filtre, hvor iltspredning har været mindre.
- Startkoncentrationen af dichlorprop i de øvre filtre har generelt været meget lav. Samtidigt er det netop disse filtre hvor iltkoncentrationen er steget mest. Der ses et forsvindende indhold af dichlorprop i disse filtre, men den meget lave start koncentration gør det svært at uddrage entydig konklusionen om årsagen.
- Det ses i nogle filtrene, at indholdet af dichlorprop stiger kraftigt efter ilttilførsel. Dette kan skyldes variationer i strømningsmønster på lokaliteten, eller at tilførsel af ilt øger frigivelse af dichlorprop fra organisk materiale eller immobile lommer.

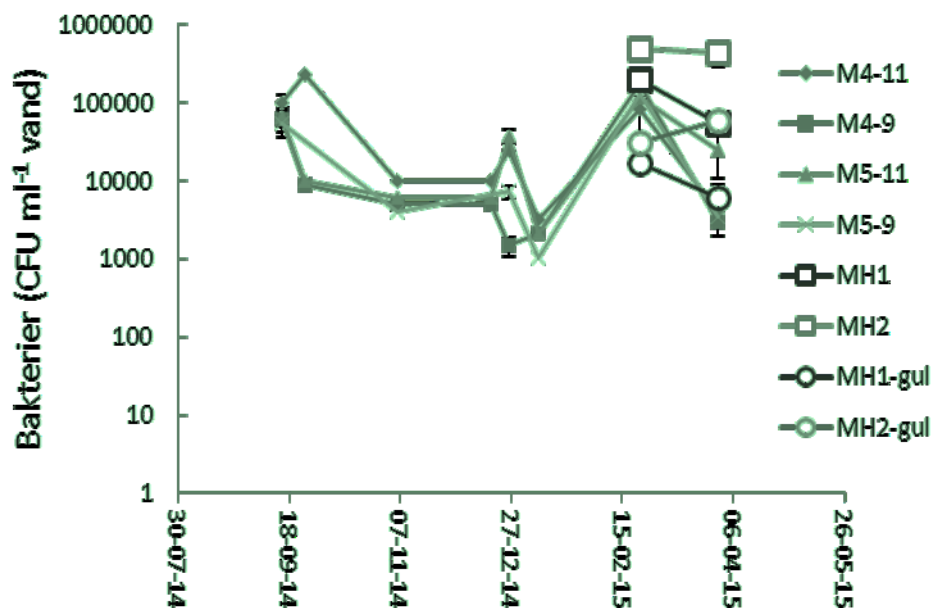
Når der i flere borerer ses et kraftigt fald i koncentrationen af dichlorprop samtidigt med at der observeres iltgennembud, kan det betyde at faldet ikke skyldes processer der er sket omkring boringen, men tilstrømning af vand der har passeret den bioaktive zone der er skabt mellem injektionsboringerne.

Resultaterne viser, at der i næsten alle monitoringsboringer er sket et fald i koncentrationen af dichlorprop i forbindelse med, at forholdene er blevet aerobe og der er tilsat bakterier. Dog kan et fald i koncentrationen ikke alene ses som bevis på nedbrydning, hvorfor der også er udført en række mikrobielle analyser for at styrke bevisgrundlaget for nedbrydning med flere lines of evidence, bl.a. mineraliseringskapaciteten i alle monitoringsboringer (se afsnit 4.4.2).

4.4 Mikrobielle parametre

4.4.1 Antal bakterier i jord- og vandprøver og samfundsstrukturen

Størrelsen og artssammensætningen af jordens mikrobielle samfund (mikrobiota) har betydning for de økosystemtjenester mikroorganismene leverer, herunder nedbrydning af miljøfremmede organiske stoffer. Ved etableringen af feltforsøget på Skelstoft blev det totale antal dyrkbare bakterier (CFU) i 9 jordprøver, udtaget i det øvre sandlag, bestemt til $1,2 \times 10^6$ g⁻¹ jord ($\pm 0,2 \times 10^6$ g⁻¹ jord; standard pladespredning på R2A medium). CFU'er blev også bestemt i de fleste af de vandprøver, der rutinemæssigt blev udtaget gennem forsøgsperioden. Figur 4.8 viser CFU-niveauet gennem hele forsøget i to af monitoringsboringerne i felt-2, samt i de borerer hvor nedbryderbakterierne blev tilført.

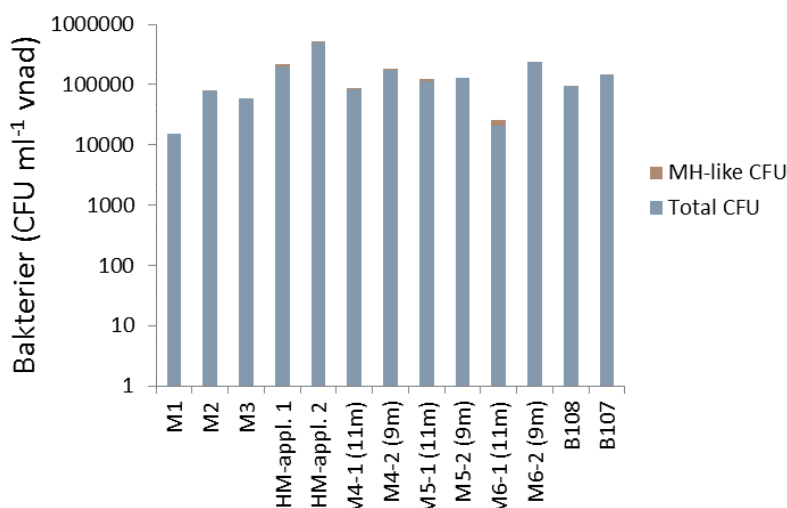


Figur 4.8 Antal dyrkbare bakterier i vandprøver i M4 og M5 borer (9 og 11 m dybde) samt i de to borer (B1, B2), hvor *Sphingomonas herbicidovorans* MH blev tilført (n=3 i de fleste prøvetagninger, bars indikerer SEM). B1-gul og B2-gul indikerer antal CFU'er med en kolonimorfologi der minder om *S. herbicidovorans*.

Den relevante information, der kan uddrages fra CFU-resultaterne er, at antallet af CFU i grundvandet er meget lavt; mellem 103 og 105. I vandprøverne hvor *S. herbicidovorans* MH blev tilført (B1 og B2) var CFU dog 2-3 gang højere end i borerne uden tilførsel af bakterier (og delvist en konsekvens heraf).

I Figur 4.9 vises CFU'er fra alle borer i begge felter få uger efter tilførsel af *S. herbicidovorans* MH.

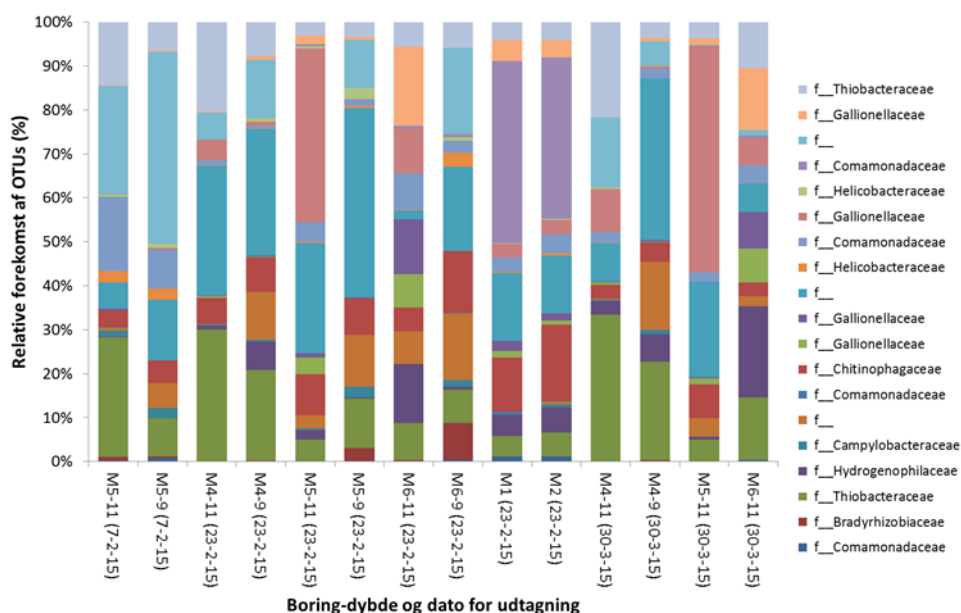
Konsekvensen af de lave bakterietætheder, og det meget homogene og statiske miljø i sandlaget, er under alle omstændigheder, at man vil forvente at måle en relativt lav diversitet.



Figur 4.9 Antal dyrkbare bakterier i vandprøver fra alle borer (begge felter) tre uger efter tilførsel af *S. herbicidovorans* MH (n=2).

Vedrørende samfundsstrukturen af den naturligt forekommende mikrobiota i grundvandet, viste 16S sekventeringen, at det mikrobielle samfund var meget artsfattigt; uanset i hvilke borer prøverne blev udtaget. De dominerende arter (tilsammen 99% af detekterede OTU'er, operationelle taksonomiske enheder svarende til en art) bestod højst af 20 arter (Figur 4.10),

hvilket tyder på et generelt artsfattigt samfund. Den lave artsdiversitet kan muligvis også gøre det mere usandsynligt, at der fra starten har været bakterier tilstede, der er i stand til at nedbryde dichlorprop. Hvis det er tilfældet, synes det nødvendigt, at tilføre bakterier der både besidder sådanne nedbrydergener og er i stand til at udtrykke dem in situ. En lav diversitet (taksonomisk såvel som funktionel) vil sandsynligvis have en negativ konsekvens for den naturlige mikrobiotas evne til at nedbryde miljøfremmede organiske stoffer. For at en biologisk nedbrydning af dichlorprop kan finde sted, er det nødvendigt, at der er bakterier i jorden, der kan producere de enzymer, som er nødvendige for at nedbrydningsprocessen kan forløbe. De målte lave CFU-værdier og den lave diversitet indikerer tilsammen, at sandsynligheden for at dette kriterie er opfyldt i jorden fra Skelstoft, er relativt begrænset.



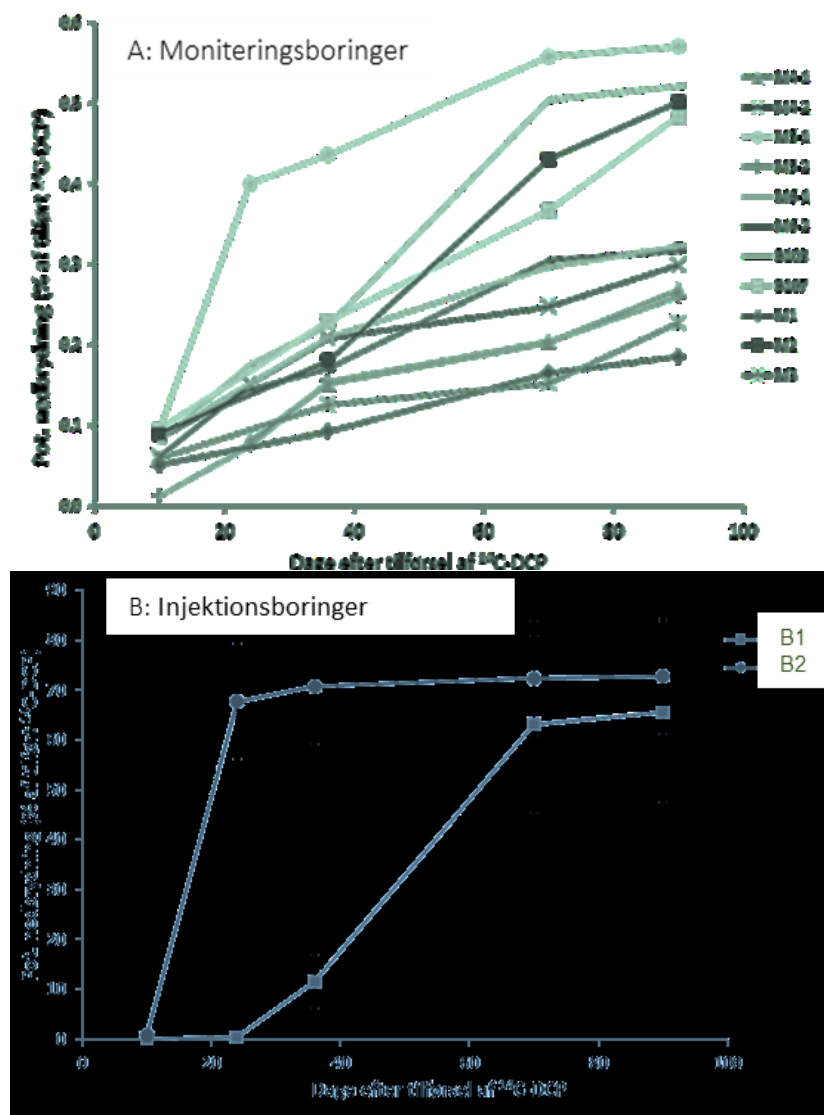
Figur 4.10 Relativ forekomst af bakterielle OTUer (taksonomiske enheder svarende til en art) i vandprøver fra de forskellige borer på Skelstoft. De angivne OTUer repræsenterer de dominerende arter, der tilsammen udgør 99% af de OTUer der findes i det mikrobielle samfund i grundvandet

4.4.2 Potentiel nedbrydning af dichlorprop i vandprøver

Potentialet for mikrobiel nedbrydning af dichlorprop blev undersøgt ved at udføre mineraliseringsforsøg med vand udtaget på lokaliteten. Ved mineraliseringsforsøg opsættes der mikrokosmer med materialet fra lokaliteten og der tilføres ¹⁴C-mærket pesticid. Hvis der er bakterier eller svampe i prøven, der er i stand til at nedbryde pesticidet fuldstændigt (mineralisering), vil de producere CO₂, der indeholder ¹⁴C fra det mærkede pesticid. Dette kan opsamles i en CO₂-fælde (1M NaOH), og ¹⁴C aktiviteten måles vha. skintillationstælling, og relateres direkte til mængden af mineraliseret pesticid som funktion af tid /11/. Aktuelt blev der udtaget vandprøver fra alle monitoreringsboringerne på Skelstoft i efteråret 2014. Prøverne (5 ml) blev inkuberet i lukkede glasflasker i en 1:1 blanding med R2B medium spiket med ¹⁴C-mærket dichlorprop. Mineralisering af dichlorprop blev målt jævnlige over en periode på 6 måneder, hvor der ikke kunne måles ¹⁴C i CO₂-fælderne (data ikke vist). Dette resultat indikerer derfor, at jorden fra felt 2 ikke indeholder naturligt forekommende mikroorganismer, der kan nedbryde dichlorprop under tilstedeværelse af ilt.

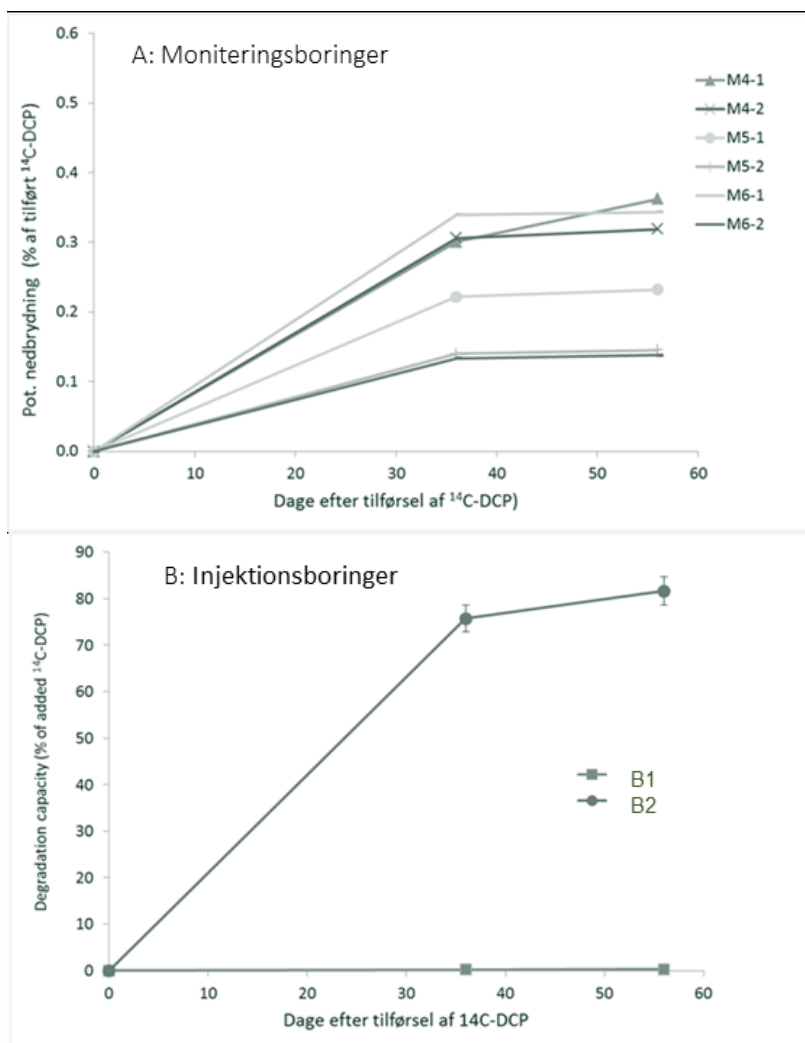
Efter tilførsel af *Sphingomonas herbivorans* MH, blev der atter taget prøver ud fra monitoreringsboringerne, såvel som fra borer B1 og B2, hvor tilførslen af bakterierne fandt sted. Potentiel mineralisering blev målt i prøverne (udtaget 23.2.2015 samt d. 30.3.2015), som beskrevet ovenfor. I Figur 4.11A (resultater fra vandprøver udtaget d. 23/2) kan det ses, at der ikke blev målt dichlorprop-mineralisering i monitoreringsboringerne i nævneværdig grad, idet ingen af prøverne viste et signifikant genfund af ¹⁴C (<0,5 % af oprindelige tilsatte ¹⁴C-mærkede dichlorprop). I modsætning hertil var der høje mineraliseringsrater i prøverne fra de

to borer, hvor *Sphingomonas herbivorans* MH var tilført (Figur 4.11). I dette tilfælde blev hovedparten (60-70%) af det tilførte dichlorprop mineraliseret.



Figur 4.11 Potentiel mineralisering i vandprøver udtaget (23.2.2015) Der kunne ikke måles en signifikant mineralisering gennem en tre-måneders periode, i de borer hvor *Sphingomonas herbivorans* MH blev tilført. Høje mineraliseringsrater blev detekteret efter få uger (n=3; SEM ikke angivet).

Sammenlignelige resultater blev opnået ved en senere prøveudtagning (30.3.2015) som vist på Figur 4.12. Op til 85 % af det tilførte ^{14}C -DCP blev mineraliseret efter 2 måneder i den ene af borerne (B2), mens der ikke mere kunne detekteres mineraliserings-aktivitet i den anden tilførsels-boring (Figur 4.12B). I lighed med prøvetagningen den 23.2.2015, kunne der ikke måles signifikant mineralisering i monitoreringsboringerne (Figur 4.12A). Ved den sidste prøveudtagning (30.3.2015) var der kun nedbrydningsaktivitet tilbage i en af B-boringerne, og det må antages, at niveauet af *Sphingomonas herbivorans* MH er blevet så lille, at DCP-mineralisering er ophørt. Det kan ikke udelukkes, at *Sphingomonas herbivorans* MH er blevet de-lokaliseret af vandstrømme i sandet og derfor ikke mere forefindes i de vandprøver der udtages fra boringen.



Figur 4.12 Potentiel mineralisering i vandprøver udtaget (30.3.2015) Der kunne ikke måles en signifikant mineralisering gennem en tre-måneders periode, i de boringer hvor *Sphingomonas herbicidovorans* MH blev tilført. Høje mineraliseringsrater blev detekteret efter få uger (n=3; SEM ikke angivet).

Samlet indikerer resultaterne fra begge prøveudtagningerne, at der ikke er mikroorganismer blandt den naturlige mikrobiota, der er i stand til at nedbryde dichlorprop. Dog viser resultaterne af feltmålinger på lokaliteten, at der forekommer kraftig fald i koncentrationen af dichlorprop ved iltning. Det er ikke muligt at konkludere om denne skyldes nedbrydning eller andre processer, da data fra mineraliseringsforsøgene ikke viser nedbrydningspotentialet. En mulig forklaring kan være at nedbrydning på feltlokaliteten skyldes bakterierne i jordprøverne, som ikke er til stede i et stort nok antal i de udtagne vandprøver. En anden forklaring kan være at den nedbrydning der observeres i monitoringsboringer skyldes naturlige tilstedeværende bakterier der dog kun kan gennemføre en ufuldstændig nedbrydning, og ikke mineralisering. Dog er der ikke set forhøjede koncentrationer af kendte metabolitter (dichlorophenoler og 4-CPP). Der er ikke målt for 2-CPP.

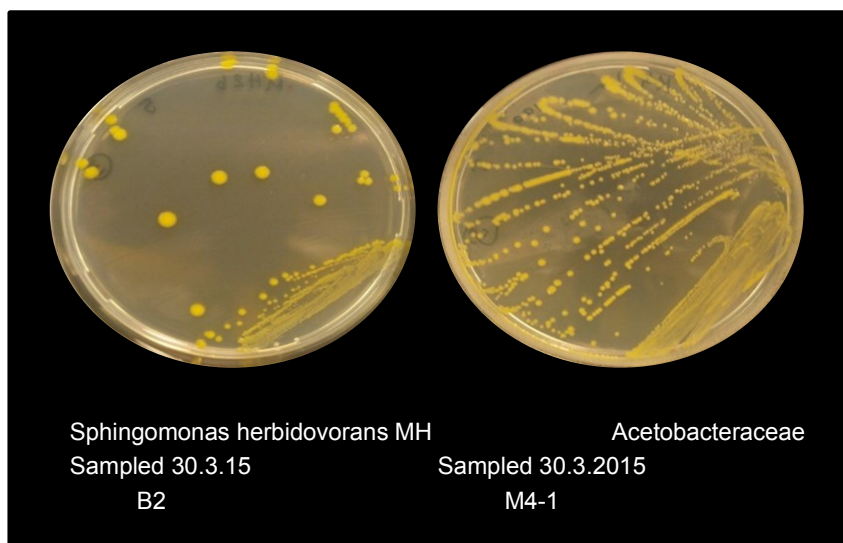
4.4.3 Bakteriel diversitet samt spredning og overlevelse af *Sphingomonas herbicidovorans* MH på lokaliteten

Det var projektets intention at karakterisere det mikrobielle samfund på lokaliteten gennem hele testperioden. Derfor blev der taget vandprøver ud fra alle boringerne og til forskellige tidspunkter. Prøverne blev ekstraheret for DNA og 16S rRNA sekvenser blev amplificeret med PCR for efterfølgende sekventering, for at bekræfte tilstedeværelse af *Sphingomonas herbicidovorans* MH.

Resultaterne herfra viste, at det ikke var muligt at detektere *Sphingomonas herbidovorans* MH i ekstrakterne fra nogen af monitoreringsboringerne i felt 2. Dette er også i overensstemmelse med resultaterne for den potentielle mineralisering af dichlorprop, hvor der ikke kunne detekteres nedbrydning af dichlorprop i nogen af monitoreringsboringerne. Det henvises til Bilag B for flere detaljer angående denne aktivitet.

Det totale antal dyrkbare bakterier blev bestemt fra vandprøver udtaget gennem hele forsøgsperioden (Figur 4.8) og kolonier, der morfologisk matchede *Sphingomonas herbidovorans* MH blev udtaget fra pladerne og gemt for senere afklaring, om de faktisk var identisk med det udsatte MH-isolat. I alt blev 10 af disse isolaters 16S DNA analyseret for sammenhold med den tilsvarende sekvens i *Sphingomonas herbidovorans* MH. Ud af de undersøgte isolater var der to, der matchede med *Sphingomonas herbidovorans* MH, mens de resterende 8 isolater tilhørte andre bakteriearter (Figur 4.13). Begge de to genfundne *Sphingomonas herbidovorans* MH blev fundet i vandprøver fra de borer, hvor de var tilført, mens *Sphingomonas herbidovorans* MH ikke blev genfundet i vandprøver fra monitoreringsboringer.

I alt betyder det, at *Sphingomonas herbidovorans* MH ikke blev transporteret i jorden (uanset dybde) – i hvert fald ikke i et omfang, der kunne distribuere dem til den nærmeste monitoreringsboring (M4), som ligger ca. en halv meter fra de borer, hvor bakterierne blev tilført. På den anden side kunne der altså detekteres dyrkbare *Sphingomonas herbidovorans* MH 55 dage efter tilførsel, men kun i de borer, hvor de var blevet tilført. Dette resultat hænger fint sammen med, at der netop i disse borer også kunne måles potentiel mineralisering af 14C-dichlorprop. Ud fra resultaterne i dette feltstudie, ser det ud til, at *Sphingomonas herbidovorans* MH har sådanne egenskaber og er i stand til at overleve i længere perioder (måneder) efter tilførsel til jord.



Figur 4.13 eksempel på to bakterier isoleret Skelstofte: *Sphingomonas herbidovorans* MH fra boring MH2 (tilførsel), samt Acetobacteraceae fra boring M4-1. De pågældende arter er isoleret fra prøver udtaget 55 dage efter sidste tilførsel af *Sphingomonas herbidovorans* MH. 16S sekventering blev anvendt ved identifikation.

5. Opsamling af erfaringer og konklusion

Formålet med projektet var på baggrund af en pilotforsøg at undersøge om aerob nedbrydning af phenoxyure-pesticider kunne stimuleres ved tilsætning af ilt suppleret med tilsætning af specifikke bakterier i felten. Forsøget er udført på en forurenede lokalitet, "Skelstoft", hvor der er konstateret en forurening med phenoxyure-pesticider, som er vurderet til at kunne udgøre en grundvandsrisiko. Strategien for pilotforsøget var at forsøge at tilføre ilt til den højpermeable zone i det øvre sandlag i det område, hvor der er konstateret de højeste forureningsniveauer med phenoxyure (især dichlorprop og 4-CP). De vigtigste konklusioner fra pilotforsøget er opsummeret i det følgende:

Overordnet forureningsituationen og geologi

På lokaliteten er der konstateret en kraftig forurening med phenoxyure-pesticider samt mindre indhold af andre pesticider som BAM, hexazinon osv. Det har ikke været muligt at lokalisere hotspottet af forureningen trods omfattende undersøgelser. Dog ses der i det øvre sandmagasin et indhold af phenoxyure-pesticider på over 100 µg/l. I forbindelse med pilotforsøget er der udført en omfattende monitoring, der viser store variationer i indholdet af phenoxyure-pesticider i den samme boring samt i meget nærliggende borer med en indbyrdes afstand på mindre end 2 meter. Desuden ses det, at de højeste koncentrationer af dichlorprop træffes i de dybeste filtre, isæt tydeligt i testfelt 2, hvor der er filtersat i to niveauer. Samme tendens er observeret på mange andre lokaliteter /15/

Der er i forbindelse med etablering af testfelter yderligere udført 15 nye borer på lokaliteten. Boringerne har igen understreget, at der ved Skelstoft optræder en meget varierede geologi. Til trods for, at testfelt 1 og 2 har en indbyrdes afstand på under 10 meter, ses der en væsentlig forskel i geologien i de to felter. Det øvre sandmagasin har en tykkelse på kun 2 meter i testfelt 1, mens der i testfelt 2 ses en tykkelse på ca. 4 meter. Derudover er de overliggende lag markant anderledes. Eksempelvis ses der et nogenlunde gennemgående, men meget tynd lerlag i felt 1, der adskiller det terrænære sand fra det øvre sandmagasin. I testfelt 2 er dette lerlag kun påvist i halvdelen af borerne, dog med en noget større mægtighed.

Tilførsel af ilt

Tilsætning af ilt til sandmagasinet er udført ved brug af diffusere. Selve styring af ilttilsætning er foregået ukompliceret. Installation af diffusere har ligeledes været nem, og det har været muligt at tilføre de ønskede mængde ilt til magasinet.

Spredning af ilt har været meget forskellige i de to testfelter. I testfelt 1 har iltkoncentrationen været lavt, trods en øget tilførsel. Til gengæld er der i testfelt 2 en god spredning af ilt over hele testfeltet. Forklaringen må være knyttet dels til strømningsretningen og dels til den forskellige geologi. I testfelt 1 ses der gennembrud af ilt i den fjerneste monitoringsboring, inden der observeres ilt i borer tættere på injektionsboringer. Det tyder på, at strømningsretningen har været mere sydlige end oprindeligt antaget. Desuden er det muligt, at iltten har spredt sig uden for testfeltet.

Målingerne af den vertikale variation i iltspredning viste, som forventet højere iltniveauet i magasinets øverste del, men den vertikale variation var meget mindre end den horisontale.

Tilførsel af bakterier

Tilførsel af bakterier er udført ved at tilføre inokulum bestående af *S. herbicidovorans* MH i filtersatte borer og derefter opblende det i grundvandet ved recirkulering. Metoden var nem at udføre i praksis, men efterfølgende dokumentation viste, at bakterierne ikke var i stand til at sprede sig nedstrøms på den pågældende lokalitet. Ved fremtidig forsøg skal der overvejes alternative metoder til bioaugmentering, der sikrer en større spredning af bakterierne, eksempelvis ved direct push eller injektion i flere borer. Senere resultater har vist en større koncentration af bakterie i boring B2, hvilket kan tyde på at recirkulering har virket mod hensigten og ikke ført til en homogen bakteriespredning mellem de to injektionsboringer.

Mikrobielle målinger i løbet af forsøget viste, at de tilsatte bakterier *Sphingomonas herbicidovorans* MH ikke blev transporteret i jorden (uanset dybde) – i hvert fald ikke i et omfang, der kunne distribuere dem til den nærmeste monitoreringsboring (M4), der ligger ca. en halv meter fra de borer, hvor bakterierne blev tilført. Målingerne viste derimod at dyrkbare *Sphingomonas herbicidovorans* MH kunne detekteres 55 dage efter tilførsel i de borer, hvor de var blevet tilført. Ud fra resultaterne i dette feltstudie, ser det ud til at *Sphingomonas herbicidovorans* MH har sådanne egenskaber og er i stand til at overleve i længere perioder (måneder). Ligeledes var de metabolisk intakte mht. nedbrydning af dichlorprop.

Vurdering af nedbrydning af phenoxysyre-pesticider og mekanismerne bagved

Resultaterne viser, at der i næsten alle monitoringsboringer er sket et fald i koncentrationen af dichlorprop i forbindelse med, at forholdene er blevet aerobe og der er tilsat bakterier. Ved pilotforsøgets afslutning er koncentrationerne af dichlorprop i begge testfelter under detektionsgrænsen.

Dog kan et fald i koncentrationen ikke alene ses som bevis på nedbrydning, hvorfor der også er udført en række mikrobielle analyser for at styrke bevisgrundlaget for nedbrydning med flere lines of evidence. På trods af, at der på lokaliteten er udført en omfattende monitoring af pesticidkoncentrationerne er det svært at uddrage konklusioner om, hvorvidt der forekommer nedbrydning på baggrund af det. Tolkning af resultater kompliceres af flere faktorer:

- Der er en naturlig variation i koncentrationer. De højeste baggrundkoncentrationer af dichlorprop ses i de nedre filtre, hvor iltspredning har været mindre.
- Startkoncentrationen af dichlorprop i de øvre filtre har generelt været meget lav. Samtidigt er det netop disse filtre hvor iltkoncentrationen er steget mest. Der ses et forsvindende indhold af dichlorprop i disse filtre, men den meget lave startkoncentration gør det svært at uddrage entydig konklusionen om årsagen.
- Der ses i nogle filtre at indholdet af dichlorprop stiger kraftigt efter ilttilførsel. Dette kan skyldes enten variationer i strømningsmønster på lokaliteten eller at tilførsel af ilt øger frigivelse af dichlorprop fra organisk materiale eller immobile lommer.
- De mikrobielle analyser har vist følgende:
- Inden injektion af bakterier ses der en lav bakterietæthed og et meget homogen miljø med lav bakterielle diversitet. En lav diversitet (taksonomisk såvel som funktionel) vil sandsynligvis have en negativ konsekvens for den naturlige mikrobiotas evne til at nedbryde miljøfremmede stoffer såsom pesticider. For, at en biologisk nedbrydning af dichlorprop kan finde sted, er det nødvendigt, at der er bakterier i jorden, der kan producere de enzymer, der er nødvendige for at nedbrydningsprocessen kan forløbe.
- Mineraliseringsforsøg inden injektion viste, at jorden på feltet ikke indeholder naturligt forekommende mikroorganismer, der kan nedbryde dichlorprop under tilstedeværelse af ilt. Derfor er det usandsynligt, at tilførsel af ilt i testfelt 1 har forårsaget sådan en stimulering af den naturlige biota, at faldet i koncentrationen af dichlorprop skyldes nedbrydning.
- Mineraliseringsforsøg efter injektion af bakterier (baseret på udtagne vandprøver fra testfelt 2) viste ligeledes, at der ikke er mikroorganismer blandt den naturlige mikro-

biota, der er i stand til at nedbryde dichlorprop. Derfor er det usandsynligt, at tilførsel af ilt og bakterier i testfelt 2 har forårsaget sådan en stimulering af den naturlige biota, at faldet i koncentrationen af dichlorprop i monitoringsboringerne skyldes nedbrydning.

- Mineraliseringsforsøg med vandprøver fra boringer, hvor der var detekteret *Sphingomonas* (dvs. fra bakterieinjektionsboringerne) viste et stort nedbrydningspotentiale. Det forventes derfor, at der i disse boringer i testfelt 2 foregår biologisk nedbrydning af dichlorprop. Der er dog ikke udtaget vandprøver til analyser af pesticidindhold fra disse boringer. En mulig forklaring på de faldende dichlorprop koncentrationer i nedstrømsboringerne i testfelt 2 kunne være, at de er påvirket fra tilstrømmende grundvand, som er strømmet igennem den bioaktive zone mellem B1 og B2.

Dog viser resultaterne af målinger på lokaliteten, at der forekommer et kraftigt fald i koncentrationen af dichlorprop ved iltning. Det er ikke muligt at konkludere om denne skyldes nedbrydning eller andre processer, da data fra mineraliseringsforsøgene ikke udviser nedbrydningspotentiale i monitoringsbrøndene. En mulig forklaring kan være at nedbrydning på feltlokaliteten skyldes bakterierne i jorden, som ikke er til stede i et stort nok antal i, men findes i jordmatrix. En mulig forklaring på den manglende nedbrydningspotentiale ved mineraliseringsforsøg kan være, at de naturligt forekommende bakterier ikke kan nedbryde dichlorprop til ende (mineralisering), hvilket vil betyde et fald moderforbindelsen, som det observeret her.

I flere boringer ses et kraftigt fald i koncentrationen af dichlorprop samtidigt med, at der observeres iltgennembrud, men uden, at der ses nedbrydning i mineraliseringsforsøg fra samme boringer. Dette indikerer at faldet i koncentrationen af dichlorprop ikke skyldes processer omkring boringen, men tilstrømning af vand, der har passeret den bioaktive zone der er skabt mellem injektionsboringerne.

Pilotforsøget illustrerer nødvendigheden for flere "lines of evidence" når det kommer til dokumentation af nedbrydning i feltet.

6. Perspektivering

På grund af kompleksiteten af de hydrogeologiske og forureningsmæssige forhold på Skelstoft har det været svært at uddrage entydige konklusioner fra pilotforsøget. Lokaliteten har vist sig ikke at være egnet som testlokalitet pga. den store naturlige variation, der er i koncentrationerne af bl.a. dichlorprop og de lokale geologiske forhold. Det havde muligvis været bedre at udføre forsøget i større testfelter, således at prøvetagning og ilt/bakterier havde en mindre påvirkning på porevandets volumen. I forhold til en fremtidig opskalering af metoden til in situ oprensning er der gjort følgende erfaringer:

Tilsætning af ilt er en billig og nem proces. Det er tilstrækkeligt at tilføre ilt i bunden af magasinet, da opdrift vil sikre den vertikale fordeling af ilt.

- Tilsætning af bakterie igennem borer er ligeledes en nem metode. Erfaringerne fra dette pilotforsøgt viste dog, at bakterierne ikke blev transporteret så langt med grundvandet som forventet. Ved større projekter anbefales det derfor at anvende alternative metoder. Disse kan være tilsætning af bakterier med direct- push eller en anden type af trykinjektion, for at sikre en bedre fordeling inden for feltet.
- Det er muligt, at der ved tilsætning af ilt og bakterier i et transekt, som i testfelt 2, kan etableres en bioaktiv zone, hvor det tilstrømmende vand behandles. Det er billigt og nemt at holde zonen aerob i længere tid, så længe ilttilførslen fortsætter. Dog kan denne metode ikke ses som en kildeoprensning, men nærmere en længerevarende faneoprensning i lighed med afværgepumpning.

De geokemiske konsekvenser af at opretholde en oxideret behandlingszone i et naturligt svagt reduceret grundvandsmagasin (sand eller kalk) vil være oxidation af det naturlige indhold af reducerede mineraler – primært pyrit. I forbindelse med pyritoxidation – og senere reduktiv opløsning af jernoxider – vil der blive frigivet tungmetaller, der naturligt forekommer som urenheder i pyrit. Nikkel og arsen er de vigtigste metaller pga. deres naturligt høje forekomst i pyrit og fordi drikkevandskvalitetskriterierne er lave – hhv. 20 og 5 µg/l. Nikkel og arsens mobilitet varierer alt efter redoxforhold og magasintype. I et tidligere TUP-projekt /16/ er de geokemiske konsekvenser af at etablere en aerob eller kemisk oxiderende zone i et grundvandsmagasin, der normalt eller naturligt har et svagt reduceret miljø, vurderet ved brug af geokemisk modellering. På baggrund deraf vurderes, at mobiliteten i svagt reducerede sandmagasiner er tilstrækkelig lav til at forebygge væsentlige følgeproblemer fra en evt. oxideret behandlingszone, idet sandets reduktionskapacitet udenfor behandlingszonen vil reducere ilt og de mobile metaller. I opsprækkede kalkmagasiner er den potentielle udbredelse af begge stoffer mere kritisk pga. de høje strømningshastigheder i sprækkerne og de noget lavere KD-værdier. Det vurderes, at især mobiliteten af arsen kan være problematisk, da den ville kunne sprede sig op til 200 meter nedstrøms i koncentrationer over drikkevandskriteriet /16/.

Vurdering af opskaleringmuligheder

Som tidligere nævnt har vi vurderet, at denne metode ikke ses som en kildeoprensning, men nærmere en længerevarende faneoprensning i lighed med afværgepumpning. Det mest realistiske opskaleringsscenario vil således omfatte etablering af en bioaktiv zone på tværs af forureningsfanen i form af et boringstransekt. Zonen bør holdes aerob så længe der strømmer forurening ud af kildeområdet, hvorfor driftstiden er sammenlignelig med andre afskærende løsninger såsom afværgepumpning. Der er foretaget en vurdering af opskaleringssomkostninger ved metoden. Det er antaget, at opskalering vil dække en fanebredde på ca. 100 meter, mens behandlingsdybden er tilsvarende testfelterne, dvs. sandmagasinet tykkelse. Det er

antaget, at der skal etableres 15 iltinjektionsboringer, 10 monitoringsboringer og at injektion af bakterier foregå med direct push. Detaljerede beregninger er vedhæftet i bilag F.

Etableringsomkostninger vurderes til ca. 2,5 mio. kr. mens de årlige driftsomkostninger vurderes til ca. 60.000 kr. om året. Til sammenligning er typiske etableringsomkostninger ved afværgepumpning 1,5-2 millioner kroner og driftsomkostninger på ca. 100.000 kr. på grund af de hyppige kulskifte skift der er nødvendige ved forurening med phenoxysyrer /17/.

På denne baggrund vurderes metoden for at være omkostningseffektiv, når den efterfølgende driftsperiode tages med i betragtningen.

7. Referencer

- /1/ Tuxen, N., Ejlskov, P., Albrechtsen, H.-J., Reitzel, L.A., Pedersen, J.K. og Bjerg, P.L., 2003. Application of natural attenuation to ground water contaminated by phenoxy acid herbicides at an old landfill in Sjoelund, Denmark. *Ground Water Monitoring and Remediation* 23, no. 4, 48-58.
- /2/ Rügge, K., Tsitonaki, K. og Tuxen, N., 2011. Pesticider i grundvand, litteraturstudium vedrørende mulige afværgeteknikker. Miljøprojekt nr. 1387, Miljøstyrelsen.
- /3/ de Liphay, J.R., Tuxen, N., Johnsen, K., Hansen, L.H., Albrechtsen, H.-J., Bjerg, P.L. og Aamand, J., 2003. In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 2003, 461-467.
- /4/ Tuxen, N., Reitzel, L.A., Albrechtsen, H.-J. og Bjerg, P.L., 2006. Oxygen-enhanced biodegradation of phenoxy acids in ground water at contaminated sites. *Ground Water*, vol. 44, no. 2, 256-265.
- /5/ Tuxen, N., Ejlskov, P., Albrechtsen, H.-J., Reitzel, L.A., Pedersen, J.K. og Bjerg, P.L., 2003. Application of natural attenuation to ground water contaminated by phenoxy acid herbicides at an old landfill in Sjoelund, Denmark. *Ground Water Monitoring and Remediation* 23, no. 4, 48-58.
- /6/ Region Sjælland, Afgrænsende undersøgelse af pesticidforurening ved Skelstoftegaard og Skelstofte Kildeplads, udarbejdet af Orbicon, Januar 2012
- /7/ Region Sjælland, Forundersøgelse i kildeområde ved Skelstofte, udarbejdet af Orbicon, rev. 1, august 2013
- /8/ Projekt om jord og grundvand fra Miljøstyrelsen, 20, 1996, Kemiske stoffers opførsel i jord og grundvand : 1 bd. <http://www.mst.dk/Publikationer/Publikationer/1996/05/87-7810-521-8.htm>
- /9/ <http://compost.css.cornell.edu/oxygen/oxygen.diff.water.html>
- /10/ Kohler HP (1999) *Sphingomonas herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:336-340.
- /11/ Frokova Z, Johansen A, Karlson UG (2015) Mecoprop mineralization potential at oxygen-reduced conditions in subsoil with phenoxyacid contaminations history. *Soil Biology & Biochemistry* 84: 189-198.
- /12/ Muller TA, Fleischmann T, van der Meer JR, Kohler HPE (2006) Purification and characterization of two enantioselective alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases, RdpA and SdpA, from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4853-4861
- /13/ Evangelista S, Cooper DG, Yargeau V (2010) The effect of structure and a secondary carbon source on the microbial degradation of chlorophenoxy acids. *Chemosphere* 79, 1084-1084.
- /14/ Zipper C, Nickel K, Angst W, Kohler HP (1996) Complete microbial degradation of both enantiomers of the chiral herbicide mecoprop ((RS)-2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propionic acid) in an enantioselective manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4318-4322.
- /15/ Regions Sjælland, Tilvejebringelse af beslutningsgrundlag for den fremtidige afværge på Stengårdens Losseplads Udarbejdet af Orbicon 6. februar 2015
- /16/ MST (2012) Udfordringer med nedbrydningsprodukter ved stimuleret reduktiv dechlorering som afværgeteknik. Miljøprojekt nr. 1445, 2012, Udarbejdet af Orbicon.

Bilag A Litteraturgennemgang af metoder til injektion af ilt

A.1 Tilsætning af ilt som afværgemetode

Tilsætning af ilt eller atmosfærisk luft er en almindelig brugt afværgemetode. Formålet med tilsætning af ilt som afværgemetode kan være at opnå fjernelse af stoffer med et højt damptryk fra jordlagene, såsom BTEX'er og chlorerede opløsningsmidler (flygtige stoffer) (oftest ved tilsætning af større mængde atmosfærisk luft), eller at øge den mikrobielle omsætning af aerobt nedbrydelige stoffer, ved eksempelvis tilsætning af ilt. /1/. For phenoxysyre-pesticider er tilsætning af ilt alene tænkt for at stimulere nedbrydningen, idet stoffer ikke er flygtige, og dermed ikke kan fjernes fysisk. Stimulering af biologisk nedbrydning af phenoxysyrer ved tilsætning af ilt har vist sig effektiv i laboratorieforsøg /2/.

Metoden anvendes i forskellige variationer, som bl.a. afhænger af behandlingszonen. Når tilsætning af ilt har til formål at stimulere biologiske processer i den mættede zone kaldes metoden for **biosparging**. Metoden kan desuden kombineres med tilsætning af næringsstoffer eller bakterier. Når metoden anvendes i den umættede zone kaldes den **bioventing**. Tilførsel af ilt kan sker ved tilsætning af luft, ren ilt, iltholdigt vand eller faste iltfrigivende materialer (f.eks. ORC) og kan også pumpes ned i borer i den mættede zone. Fælles for metoderne er, at de alle er mest effektive og afprøvede i sandede jordlag eller grovere jordtyper /1/.

A.1.1.1 Udfordringer i lavpermeable aflejringer

Ved anvendelse af tilførsel af ilt i en lavpermeabel geologi såsom f.eks. moræneler, er der forskellige udfordringer:

- Forureningsstoffer fra lavpermeable jordlag kan frigives langsomt, hvilket kan føre til en rebound effekt efter behandlingen er afsluttet.
- Lavpermeable jordlag i den mættede zone, kan udgøre en barriere for luftstrømningen og medføre, at den indblæste luft under opstigningen i grundvandszonen strømmer ud af oprensingsområdet og ikke berører de forurenede jordlag.
- I den umættede zone vil modstanden mod injektionen af luft være meget varierende og virkningsgraden lille.
- Sprækker og rodkanaler i eksempelvis opsprækket moræneler kan føre til præferentiel strømning af ilt, uden at der sker kontakt mellem ilt og forureningen.

Ved alle iltleveringssystemerne er en af de primære udfordringer, at der kan ske en tilklogning på overfladen af borerne. Tilklogning kan både skyldes bakterievækst samt oxidation og udfældning af reducerede komponenter /1/.

Der har i de seneste år været stor efterspørgsel på afværgemetoder, der kan anvendes på lavpermeable lokaliteter, som alternativ til opgravning og termisk oprensning. In situ metoder, der omfatter tilsætning af reagenter i væskeform (kemiske eller biologiske) i ler, er begrænset af den meget langsomme diffusionshastighed af stoffer opløst i væsken inde i leren. For de biologiske metoders vedkommende kan selve reaktionen, der omsætter forureningen, ligeledes foregå relativt langsomt.

Derudover er det med de nuværende injektionsmetoder ikke muligt at injicere reagenterne med en tæthed og homogenitet, der gør diffusionstiden mellem intervallerne kort nok til at opnå en operationel oprensningstid (mindre end 10-20 år).

Der er således ofte en begrænsning i at kunne injicerede de ønskede væskemængder i formationen for at opnå oprensningen. Efterhånden er der i Danmark adskillige erfaringer med udfordringerne i forhold til at opnå en jævn fordeling af reaktanter i moræneler /3/. Det er flere steder observeret, at de tilførte væsker følger naturlige sprækker og linser med høj permeabilitet, og således fordeles meget ujævnt i matricen. Erfaringer fra tidligere projekter /3,4/ har også vist, at vertikale injektionsboringer med lanser eller Geoprobe sjældent opnår en jævn fordeling af de tilførte væsker. Typisk vil meget af væsken spredes i de allerøverste jordlag, samt følge de naturlige sprækker og linser opad i formationen. I de seneste år har nyere metoder som elektrokinetisk assisteret injektion af reagenter har vist sig lovende /5/.

På baggrund af erfaringerne med tilsætning af væske i ler, er der i dette projekt fokuseret på at undersøge gasformig tilførsel af ilt til lavpermeable aflejringer, med henblik på at stimulere aerob biologisk omsætning. Umiddelbart forventes dette dog også at kunne have de samme begrænsninger som væsketilførslen mht. præferentiel strømning. På den anden side er diffusionshastigheden i gasfasen ca. 4 størrelsesordener hurtigere end i væskefasen, hvorfor der overordnet kan forventes en hurtigere spredning af ilt i matricen. Diffusionen vil til dels være begrænset af vandindholdet i moræneleret, men det kan forventes, at ilt vil opløses i porevandet.

I de kommende afsnit præsenteres resultater fra vores litteraturgennemgang vedrørende metoder og erfaringer med tilførsel af ilt til lavpermeable aflejringer.

A.2 Metode og afgrænsning af litteraturgennemgangen

Der er udført en bred søgning af den grå litteratur for metoder, der omhandler tilsætning af ilt eller anden gas i moræneler. Søgningen er udført på Google og Google Scholar samt relevante hjemmesider/databaser såsom Clu-in.org, USEPA, Videncenter for jordforurening Lix. Der er søgt i den danske og internationale litteratur med flere forskellige søgeord og kombinationen af dem som vist på nedenstående Tabel A.1.

Søge ord	Kombineret med
Biosparging, bioventing, Air injection, Oxygen injection, Air sparging	Low permeability, low permeable, clay

Tabel A.1 Søgeord

Kun erfaringer vedrørende lavpermeable aflejringer og tilførsel af ilt i gasform er medtaget i de følgende afsnit. Detaljerede opsamlinger af princip bag, samt erfaringer med metoder som airsparging og biosparging i højpermeable lokaliteter er tilgængelige fra flere kilder /6-10/.

A.3 Metoder til tilførsel af ilt på gasform

Mens det som tidligere nævnt er forholdsvis let at tilvejebringe aerobe forhold i akviferer, som f.eks. sandmagasiner, er det langt vanskeligere at opnå dette i akvitarder, som moræneler. På grund af de forskellige hydrauliske egenskaber vil metoderne til at opnå aerobe forhold være væsentligt forskellige. I det følgende behandles disse derfor i separate afsnit.

A.3.1 Tilførsel af ilt i akviferer/høj permeable lag

Tilsætning af ilt på gasform kan ske ved forskellige metoder:

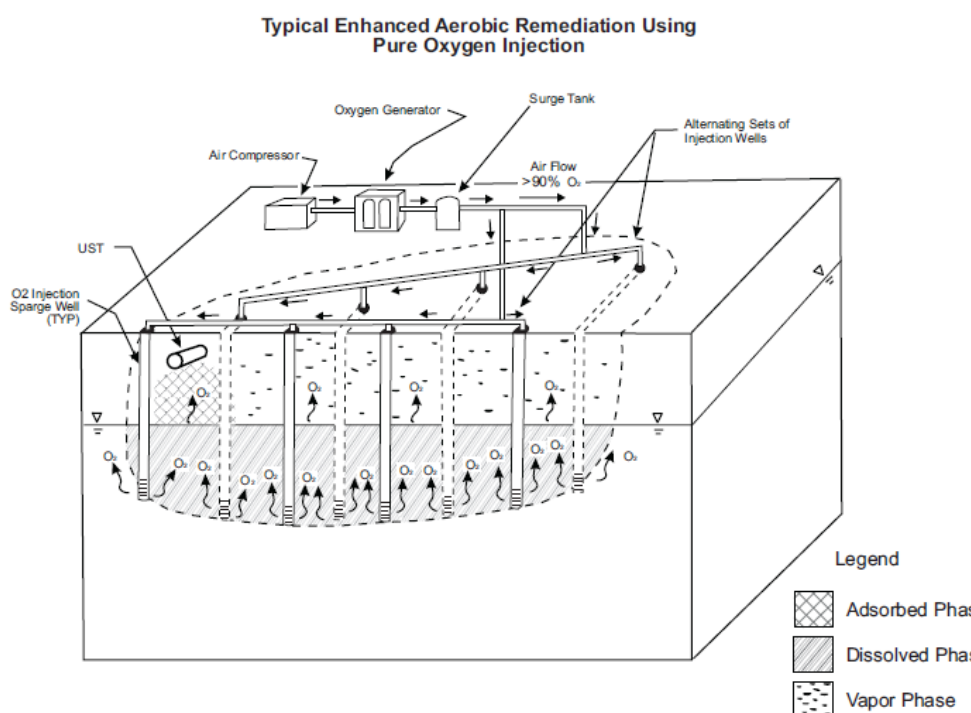
- Ilt kan tilsættes i ren gas form eller som atmosfærisk luft ved trykinjektion i vertikale boringer eller injektionsspyd.

- Der kan installeres borer, der langsom afgiver ilt (Waterloo emitter). Det drejer sig om at føre en porøs slange ned langs en sondering, hvorfra der sker en langsom diffusiv frigivelse af ilt.
- Der kan installeres vandrette borer, hvori slanger langsomt afgiver ilt til vandet ved diffusion.

A.3.1.1 Injektion af ilt/atmosfærisk luft ved trykinjektion

Ved airsparging indblæses atmosfærisk luft under grundvandsspejlet. Hensigten er her, at flygtige stoffer, som kulbrinter eller chlorerede opløsningsmidler opløst i grundvandet, diffunderer over i gasfasen, hvorefter den indblæste luft med forureningskomponenterne fjernes ved vakuumventilation af en overliggende umættet zone. Under denne proces vil iltindholdet i grundvandet blive bragt i ligevægt med atmosfærisk luft, dvs. mængden af opløst ilt vil være ca. 11 mg/l. Metoden er meget udbredt, både i Danmark og udlandet og er velbeskrevet i f.eks. /1/. Det har længe været kendt, at tilførslen af atmosfærisk luft til grundvandsmagasinet ved airsparging/bioventing har stimuleret den aerobe bionedbrydning af f.eks. kulbrinter, se f.eks. /6/. Ved at tilføre ilt som gas i ren form (>95% ilt), kan der opnås en langt højere koncentration af opløst ilt i grundvandsmagasinet, op til 40-50 mg/l og dermed reducere den mængde af gas, der skal indblæses i magasinet for at opnå tilstrækkelig ilttilførsel til den aerobe nedbrydning. Tilbageholdte iltbobler i porestrukturen i jordmatricen forlænger kontakttiden mellem det gasformige ilt og det iltfattige grundvand, ligesom den høje iltkoncentration øger spredningen ved diffusion af den opløste ilt i grundvandet og sikrer en hurtigere spredning af ilt, pga. af de større kemiske gradienter i systemet og tilstedeværelsen af en mere eller mindre sammenhængende gasfase. /6/.

Typisk injiceres ilt til magasinet fra traditionelle borer, der er filtersat under den forurenede zone, se Figur A.1. Der anvendes typisk forholdsvis lave injektionsrater, for at opnå stor opholdstid i magasinet og derved få så lille tab af ilt til atmosfæren som muligt.



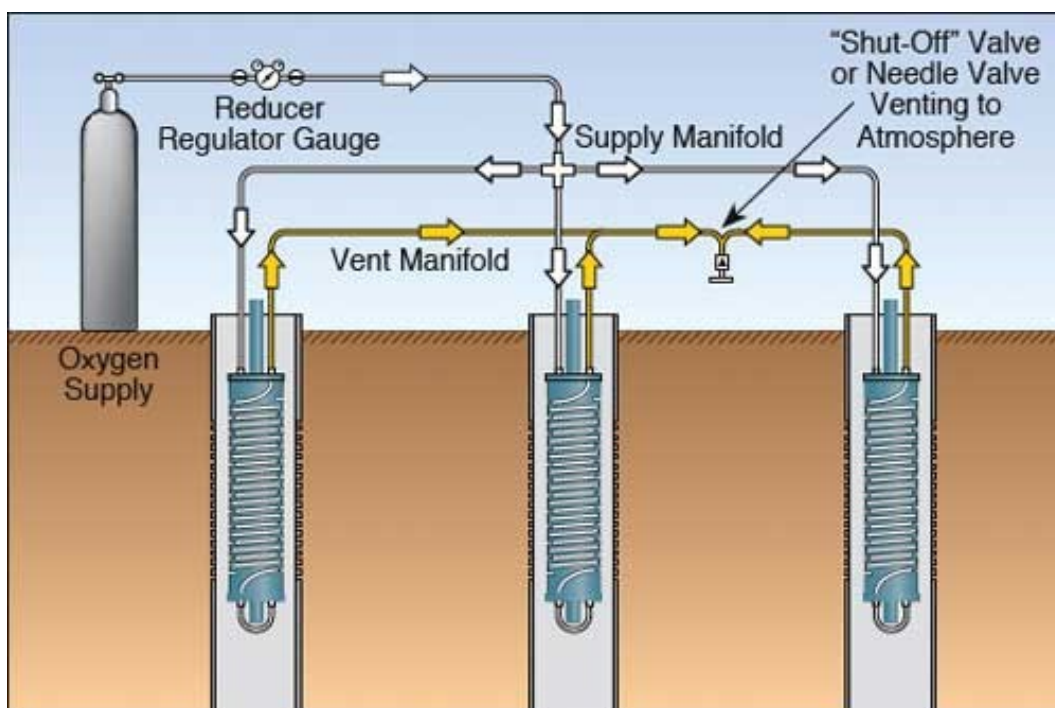
Figur A.1: Typisk setup for injektion af ren ilt jf. /6/

Ved at indblæse ilten sekventielt i de enkelte borer, kan der opnås god kontrol med mængden af indblæst ilt i de enkelte borer. Eksempler på kommerciel anvendelse af injektion af ren ilt for bioremediering er f.eks. Matrix Oxygen Injection System, hvor ren ilt injiceres i grundvandet gennem konventionelle borer /11/.

A.3.1.2 Iltmittere

Hvor der er risiko for et stort tab til atmosfæren af den indblæste ilt, f.eks. i frie magasiner, kan man med fordel anvende systemer, hvor ilten langsomt diffunderer over i grundvandet gennem permeable slanger, således at ilten opløses i vandet ved kontakten med de permeable slanger.

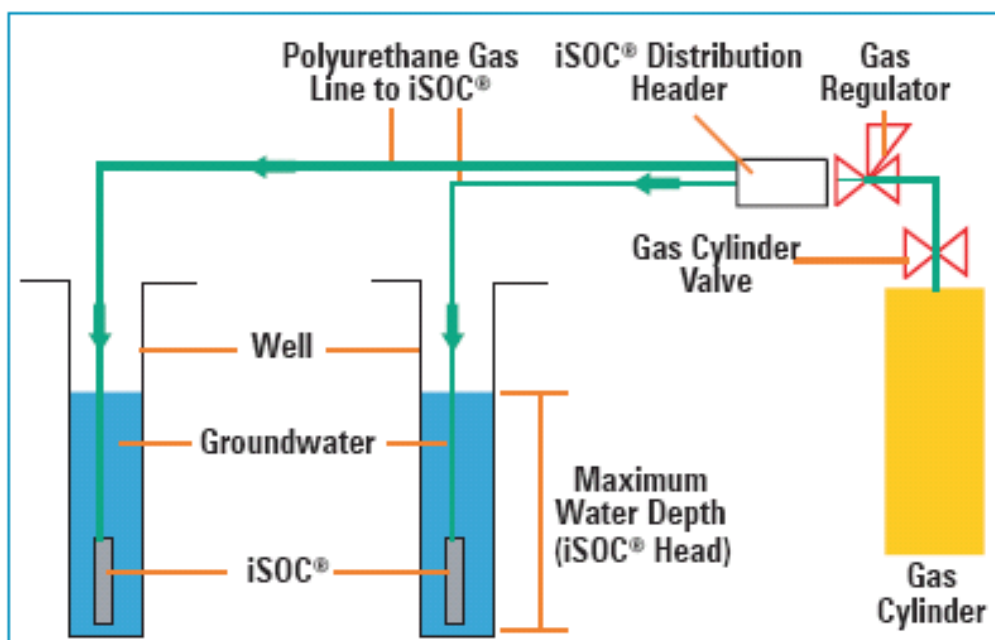
Der findes flere systemer, der fungerer efter dette princip. Meget udbredt er Waterloo Emittere /12/, som er særlige indsatser til filtersatte borer, hvor ilttilførslen sker ved diffusion af ilt gennem en kunststofslange, der er spiraliseret i filterintervallet, se Figur A.2.



Figur A.2: Installationsprincip for Waterloo Emittere

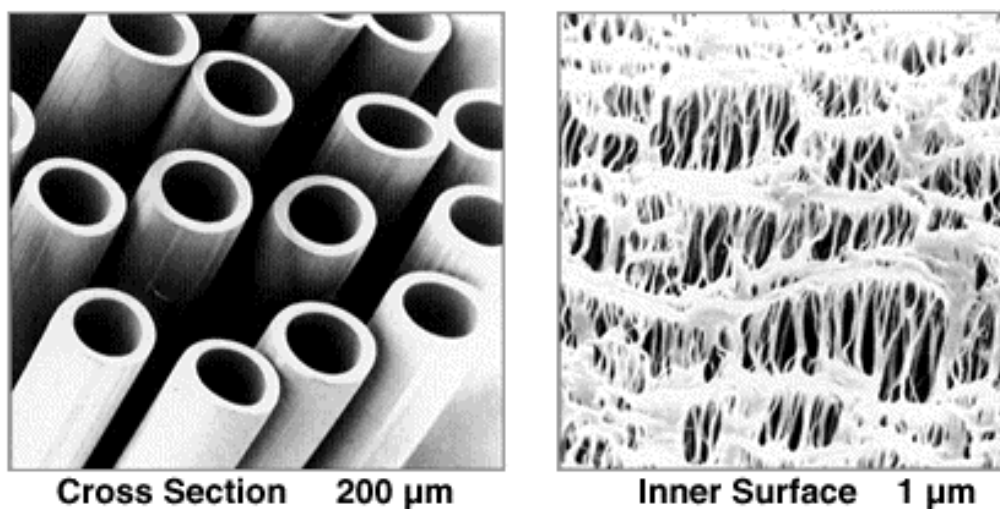
Slangen kan være udført af silikone eller LDPE. Valget af slangemateriale afgøres af det ønskede arbejdstryk og den ønskede diffusion, hvor siliconeslangen giver langt den højeste diffusion. Emmitterenheden (spiralen) er ca. 1 m lang og fås opviklet i 3 diameter (45,7 mm, 96,5 mm og 147 mm). Diameteren på selve iltslangen er typisk 8 mm og med et arbejdstryk på 1,4 bar (det højest mulige) vil der diffundere ca. hhv. 3, 3,6 og 7,3 liter ilt ud gennem slangen pr dag, svarende til hhv. 4,2 g/dag, 5,1 g/dag og 10,5 g/dag. Den største emitter vil således kunne hæve den opløste iltmængde i 2 m³ grundvand fra 0 til 5 mg/l på ét døgn, hvis der ikke tages hensyn til iltforbruget til oxidation af sedimentet. Ved et iltforbrug på 2 mg/g til at oxidere sedimentet (som er tidligere observeret i laboratorieforsøg /2/, svarer produktionen fra én stor emitter til oxidationen af ca. 0,003 m³/døgn.

Efter samme koncept som Waterloo Emittieren, men med en langt simplere opbygning er iSOC® enheden /13/.



Figur A.3: iSOC-emitter setup

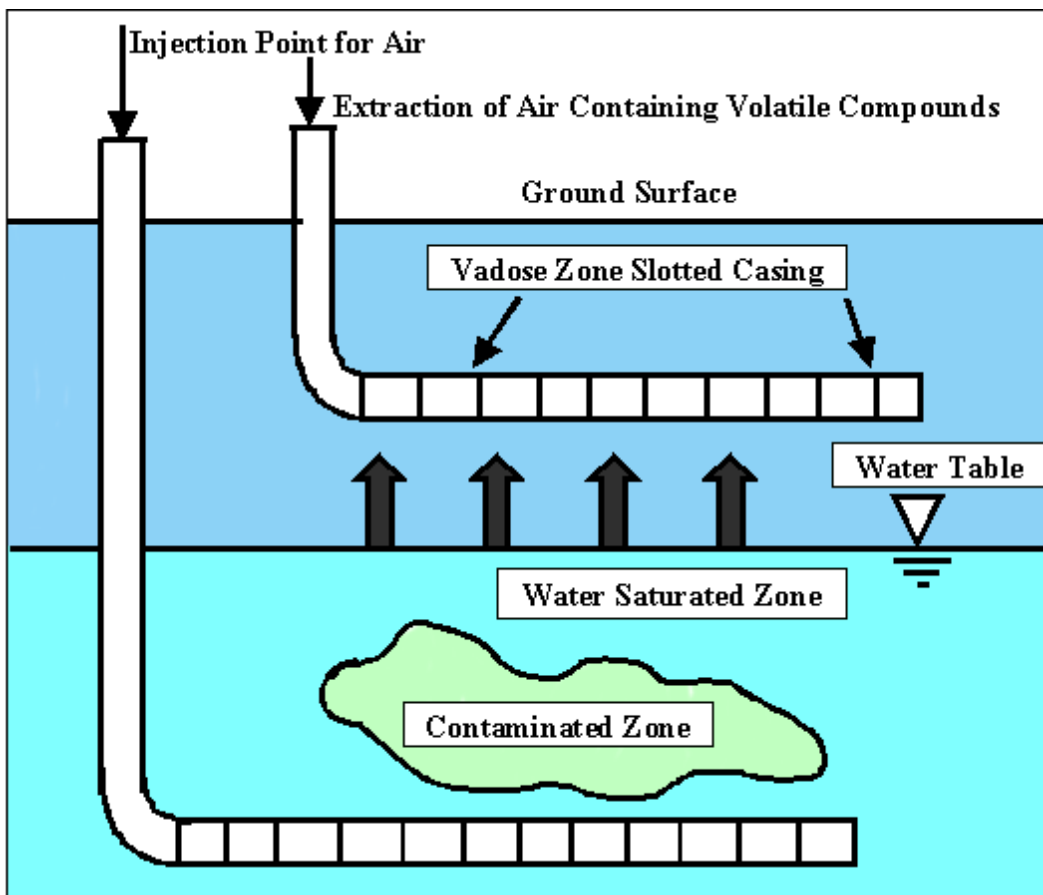
iSOC- Emitteren placeres i en filtersat boring på samme måde som Waterloo Emitteren. Hver enhed leverer ca. 40 gram ilt pr. døgn ved et indvendigt arbejdstryk på 4 atm. I forhold til Waterloo Emitteren er iSOC-emitteren altså ca. 4 gange så effektiv. Ildiffusionen sker gennem et "inFusion" rør, der er opbygget af polymermatrice fremstillet af mikrohulfbre.



Figur A.4: Opbygningen af inFusion rør /17/

A.3.1.3 Iltinjektion fra horisontale borer

I mange år har indblæsning af luft i vandrette borer været anvendt ifm. air-sparging i akviferer /6/. Metoden må derfor anses for at være veldokumenteret og effektiv. Princippet for metoden kan ses på Figur A.5.



Figur A.5: Princip for tilførsel af ilt ved horisontale borer, Kilde <http://www.frtr.gov/matrix2/section4/D01-4-36.html>

A.3.2 Ilttilførsel i akvitarder

Udfordringen ved injektion af ilt i lavpermeable jordarter er at få fordelt ilt i den lavpermeable jordmatrix. Ved at anvende ren ilt opnås den største diffusionsgradient fra injektionspunktet. Ved de to eneste eksempler på injektion i akvitarder er der således også anvendt ren ilt. Tilsætning af ilt kan som tidligere nævnt ske ved forskellige metoder:

- Ilt kan tilsættes i ren form eller som atmosfærisk luft ved tryk injektion
- Ilt diffusion fra lange vandrette borer

A.3.2.1 Trykinjektion af ilt gennem lanser

Ilt kan tilsættes i ren form eller som atmosfærisk luft ved tryk injektion igennem lanser. Metoden er afprøvet i Danmark på en slamkridt lokalitet, se afsnit A.4

A.3.2.2 Ilt diffusion fra horisontale borer

Horisontale borer kan anvendes i lavpermeable aflejringer. Der findes meget få felterfaringer (se afsnit 2.4), men i princippet vil horisontale borer give mulighed for at tilsætte ilt over et større areal og komme i kontakt med flere vertikale sprækker og kanaler der kan øge transporten.

Selvom der ikke er fundet eksempler i litteraturen kunne en kombination af ovenstående og diffusion a'la Waterloo Emitters også tænkes ved at installere permeable slanger i den vandrette boring frem for traditionelle filtre, f.eks. inFusion slanger, se iSOC-emitter.

A.4 Erfaringer fra tilsætning af ilt i lavpermeable aflejringer

Ved søgning i litteraturen er der fundet et meget begrænset antal erfaringer, hvor tilsætning af ilt er afprøvet i lavpermeable lokaliteter. Selv i disse tilfælde er der oftest tale om lokaliteter af blandet permeabilitet med højt indhold af silt, mens der ikke er truffet artikler/rapporter, der beskriver erfaringer på lokaliteter, hvor tilførsel af ilt er foretaget i moræneler.

Jf. en tidligere erfaringsopsamling om bioventing fra USEPA /7/ kan teknikken anvendes på lokaliteter med en permeabilitet på 10^{-5} m/s, svarende til fint sand. Når permeabiliteten er mindre end 10^{-7} m/s, som typisk er tilfældet ved moræneler er det den sekundære porøsitet (sprækker og indslag af sandlommer, der driver iltspredningen). Positive erfaringer fra lavpermeable lokaliteter er hovedsageligt i siltede jordlag som vist på Tabel A.2. Kombinationen af højt vandindhold og lav permeabilitet har tidligere ført til mislykkede applikationer /7/.

I Danmark er der kendskab til én lokalitet med lavpermeabel geologi, hvor der tidligere har været udført afværge ved injektion af ren ilt produceret on-site for at accelerere bionedbrydning /12/. I dette tilfælde var der tale om en benzinfurening i slamkridt på Møn med en forurening ned til 12 m u.t. Tilførsel af ilt foregik gennem lanser, ved en lanse af gangen. Der blev observeret høje ilt koncentrationer 10-20 meter fra injektionsboringerne. Driften af ovennævnte anlæg viste, at det var realistisk inden for ét år at injicere 12 tons ren ilt i den forurenede zone, og at etablere aerobe forhold i grundvandet i en afstand af op til 15 m fra iltinjektionspunkterne, (baseret på iltmålinger i grundvand fra monitoringsboringer). Forureningen på Møn var koncentreret i slammet skrivkridt som har en pastaagtig konsistens og meget lav permeabilitet. De hydrauliske forhold på lokaliteter kan dermed sammenlignes med slamkridtets, om end de hydrauliske ledningsevner muligvis er endnu lavere her.

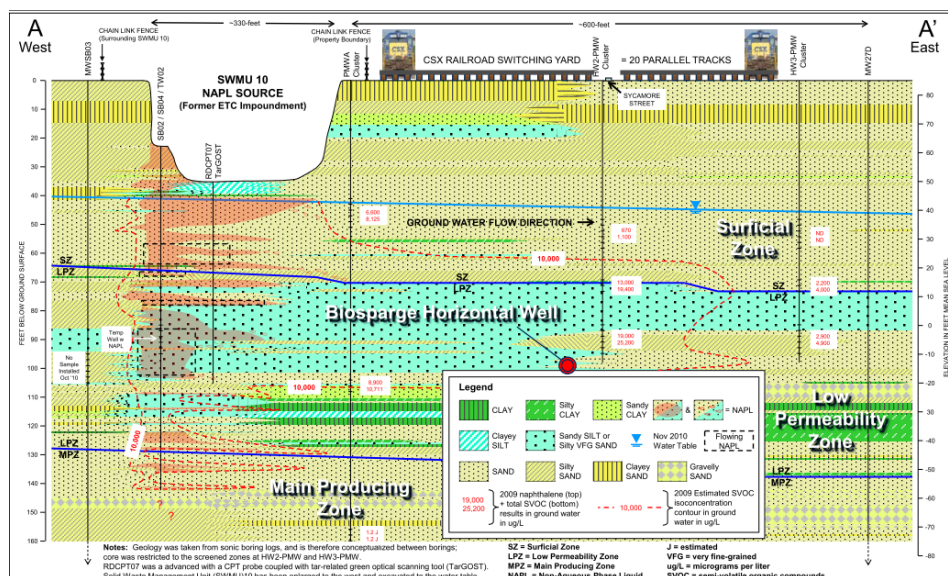
Lokalitet	Metode til ilttilsætning	Forureningstype	Geologi	Resultat
Beale AFB Californien	Vertikale airsparging boringer	Oliekulbrinter	Silt	50-95 % reduktion i poreluftskoncentrationer
Eielson	Vertikale airsparging boringer	Oliekulbrinter	Silt	50-96% reduktion i poreluftskoncentrationer
Møn	Vertikale lanser/trykinjektion	Benzin	slamkridt	25-95 % reduktion i grundvandskoncentrationer
Florida, Gasværk	Horisontale boringer	Naphtalen		50-95 % reduktion i det underliggende magasin

Tabel A.2 Oversigt over lavpermeable lokaliteter med positive erfaringer for ilttilførsel

Horisontale boringer har været anvendt til iltinjektion til biostimulering af nedbrydning af PAH-er på et tidligere gasværk i Florida /11/. Gennem 3 horisontale boringer injiceredes ilt i en lavpermeabel zone under et tidligere anlæg for trækonservering, se Figur A.6 og Figur A.7. I en 440 m lang foret, horisontal boring 30 m u.t. blev installeret 3 filtre af hhv. rustfast stål, HDPE og ADS. Længden af de enkelte filtre var ca. 50 m. Gennem en periode på i alt 120 dage injiceredes op til ca. 50 kg 90% ilt pr. dag. I 3 monitoringsboringer i afstande på 1,5 m, 3 m og 4,5 m fra injektionsfiltrene filtersat i dybder på 16 m, 21 m og 28 m observeredes mængden af opløst ilt. I de dybe filtre, 2 m over injektionsfiltrene opnåedes et indhold af opløst ilt på mindst 51 mg/l. I de to højere filtre steg indholdet af opløst ilt til mindst 10 mg/l. Antallet af aerobe bakterier steg med 4 størrelsesordener og mængden af opløst naphthalen blev reduceret med mellem 50% og 95 %. Forsøgsresultaterne viste, at der blev opbygget et iltreservoir i en semiakvifer af silt og fint sand således, at de høje ilt-niveauer bestod i længere tid efter injektionen. Installation af den horisontale boring er udført i et siltet lag, hvorfra iltten har bevæget sig til de overliggende sandede og siltede lerlag.



Figur A.6 Setup for horisontal iltinjektionsboring i Florida /11/



Figur A.7 Konceptuel model af lokaliteten. Den horisontale boring er udført i et lag af moderat permeabilitet /11/

A.5 Projekteringsparametre for ilttilførsel

Inden en afværgelse med tilførsel af ilt igangsættes anbefales det at bestemme en række lokalitetsspecifikke parametre. En oversigt over disse, og deres betydning ses i nedenstående Tabel A.3. I nærværende projekt er flere af parametrene bestemt i forbindelse med forureningsundersøgelsen, og de resterende vil bestemmes som en del af detailprojekteringen.

Parameter	Betydning	Bestemt på Skelstofte
Permeabilitet	Permeabiliteten er styrende for hvor meget gas der kan tilføres i behandlingsområdet	Ja
Jordens naturlige vandindhold	Højt vandindhold kan begrænse gasdiffusion	Ja
Jordens lerindhold/kornstørrelsesanalyse	Giver et billede af jordens permeabilitet og oxidant forbrug.	Ja
Jordens iltforbrug	Jordens mineraler og organiske materialer kan forbruge ilt og dermed afgøre, hvor meget ilt der skal tilsættes for at opnå aerobe forhold	Bestemmes i forbindelse med detailprojektering
Test af stoffernes aerobe nedbrydelighed	Det er en nødvendig succesfaktor at stofferne nedbrydes under aerobe forhold. Det kan testes ved mikrokosmostests, med jord fra lokaliteten, hvor der tilsættes ilt i flaskerne. Hvis de naturlige forekommende bakterier ikke kan nedbryde stofferne kan det overvejes at tilsætte specifikke nedbrydere.	Det er kendt af stofferne kan nedbrydes aerobt. Der ses nedbrydningsprodukter på lokaliteten
Gas-flow tests	Ved større feltapplikationer, udføres der in situ tests af gas tilsætning i et mindre område, inden opskalering	Udføres som en del af pilottest
Målinger af influensradius	Ved større feltapplikationer, udføres der in situ tests af gas tilsætning samt målinger af iltindholdet i nærliggende borer for at bestemme antal af iltinjektions borer ved fuld skala	Udføres som en del af pilottest

Tabel A.3 Oversigt over projekteringsparametre for ilttilførsel /15,16/

Referencer

- /1/ Amternes Videncenter for Jordforurening (2003): Afværgehåndbog om chlorerede stoffer i jord og grundvand. Teknik og Administration nr. 4.
- /2/ Tuxen, N. (2002) PhD Afhandling In situ bioremediation of groundwater contaminated by herbicides from point sources Environment & Resources, DTU, Technical University of Denmark
- /3/ Naturstyrelsen (2011): Erfaringsopsamling med injektion af oxidanter i moræneler, Baldersbækvej 5, 2635 Ishøj, Udarbejdet af Orbicon, juni 2011
- /4/ Region Hovedstaden (2011): TEST AF DOKUMENTATIONSMETODER - VADSBYVEJ 16A, Udarbejdet af Orbicon A/S, maj 2011
- /5/ EK SICO
- /6/ EPA (2003): How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewers, <http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm>
- /7/ US-EPA Clean-Up Information, Airsparging: http://www.clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/Air_Sparging/cat/Overview
- /8/ Miljøstyrelsen: Arbejdsrapport nr. 9, 1997, Air sparging fra horisontal boring.
- /9/ Miljøstyrelsen: Miljøprojekt 480, 2000, Airsparging og vakuumventilation fra vandrette boringer på Drejøgade 3-5.
- /10/ Amternes Videncenter for Jordforurening: Afværgekatalog og Projekteringsparametre: http://jordforurening.info/afvaerge/metode_udskriv.php?id=10 og http://jordforurening.info/afvaerge/metode_udskriv.php?id=19
- /11/ Matrix Oxygen Injection System: <http://www.matrixbiotech.com/>
- /12/ SEACOR Environmental Inc. (2005) Douglas A. Sweeney og Ian Young: Installation and monitoring of a Waterloo Emitter™ System, <http://www.esaa-events.com/remtech/2005/pdf/Paper21.pdf>
- /13/ inVentures Technologies Inc: <http://www.isocinfo.com//>
- /14/ Lars Chr. Larsen (1998) In-situ oprensning af benzinfurennet kridt ved iltinjektion, ATV-vintermøde 10-11 marts 1998
- /15/ Videncenter for jordforurening, Afværgekatalog <http://jordforurening.info/afvaergekatalog.php?lang=dk>
- /16/ Government of Canada, Guidance and Orientation for the Selection of Technologies. Bioventing http://gost.irb-bri.cnrc-nrc.gc.ca/tfs.aspx?ID=10&ind_lang=en
- /17/ inVentures Technologies Incorporated, produktblad, <http://www.biosysinfo.com/html/Gas%20inFusion%20Products.pdf>
- /18/ Butler, C, Mott-Smith, E, Turner, TR, Spalvins, E og Carter, S (2011): Injection of Oxygen in Deep Horizontal Wells for the Biostimulation of PAH Degradation at a Former Wood Treating Superfund Site, International Symposium for Bioremediation and Sustainable Technologies, Reno 2011.

Bilag B Oversigt over mikrobiologiske analyser og resultater på Skelstofte

Dette notat er udarbejdet af Aarhus Universitet

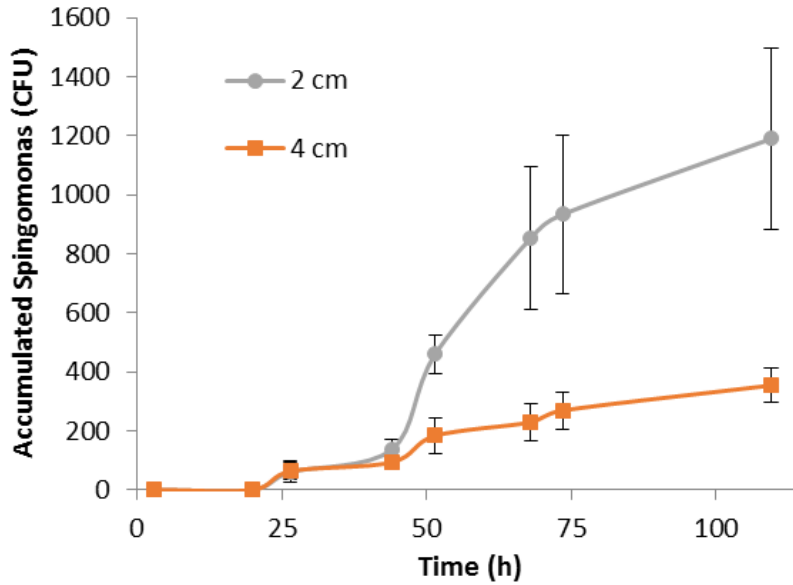
Transportforsøg i kolonneopsætning.

Dichlorprop er meget resistent for nedbrydning i miljøet og kun få mikrobielle nedbrydere er afrapporteret i litteraturen. *Sphingomonas herbicidovorans* MH er et veldokumenteret eksempel på en effektiv nedbryder af phenoxysyrer generelt, herunder dichlorprop (Kohler, 1999; Frokova, 2015). Det blev derfor besluttet, at anvende dette nedbryderisolat i in situ forsøget ved Skelstofte.

For at forhåndsvurdere om *Sphingomonas herbicidovorans* MH kunne forventes at transporteres i jorden, blev der udført en række kolonneforsøg i laboratoriet. Som kolonnematrice blev der anvendt materiale udtaget fra skelstofte i forbindelse med etablering af brønde til det senere in situ forsøg. Jorden/sandet var meget homogen i tekstur og blev pakket i kolonnerør (60-ml sterile plast injektionssprøjter, diameter 40 mm) i tykkelser af 2 og 4 cm (n=3). Rørene blev vibreret forsigtigt for at sikre homogen pakning uden luftlommer. Herefter tilførtes en vasket (100 µl; 0,1 PBS) kultur af *Sphingomonas herbicidovorans* MH ($\sim 1,1 \times 10^4$ celler per kolonne) langsomt til centrum af kolonneoverfladen for at sikre opsugning i midten af kolonnen. I et parallelt sæt kolonner blev der tilført en tilsvarende mængde væske uden *Sphingomonas herbicidovorans* MH, for at kunne estimere baggrunds niveauet af bakterier med en lignende kolonimorfologi. Vandbevægelsen i sandet på Skelstofte er estimeret til ~ 5 cm i døgnet og der blev derfor dagligt tilført vandværksvand til toppen af kolonnerne i en mængde svarende hertil. Kolonnerne blev overdækket og perkoleret vand blev opsamlet i sterile rør, hvorfra der blev udtaget prøver til tælling af dyrkbare bakterier (CFU, 0,1 TSB, N=3).

Resultaterne fra kolonneforsøgene viste, at et vist antal *Sphingomonas herbicidovorans* MH overlevede og blev transporteret gennem kolonnerne. I Figur B.1 fremgår det, at *S. herbicidovorans* begynder at bryde igennem kolonnen ca. 2 døgn efter tilførsel af kolonnen. Det akkumulerede antal af gennem-perkolerede *S. herbicidovorans* udgør henholdsvis 11 og 3 % af det oprindeligt antal tilførte celler på 2 og 4 cm kolonnerne. *S. herbicidovorans* danner kolonier der er helt orange og deres kolonier er nemme at genkende på diverse faste medier. I prøver fra jord vil der sandsynligvis også forekomme andre typer af sphingomonader, med en lignende kolonimorfologi. Men deres antal vil højst sandsynligt være meget lavt i sammenligning med det antal *Sphingomonas herbicidovorans*, der blev tilført aktuelt og derudover forekom der ikke kolonier, svarende *Sphingomonas herbicidovorans* MH, i baggrunds-kolonnerne. Det kan derfor konkluderes, at et vist antal *Sphingomonas herbicidovorans* MH overlever mere end 5 døgn i jorden og transporteres gennem denne, omend i moderate mængder. Da kun 3% af nedbryder isolatet blev transporteret over 4 cm i løbet af 5 d, forventede vi kun en begrænset spredning til de nærmeste monitoreringsbrønde, i det senere feltforsøg.

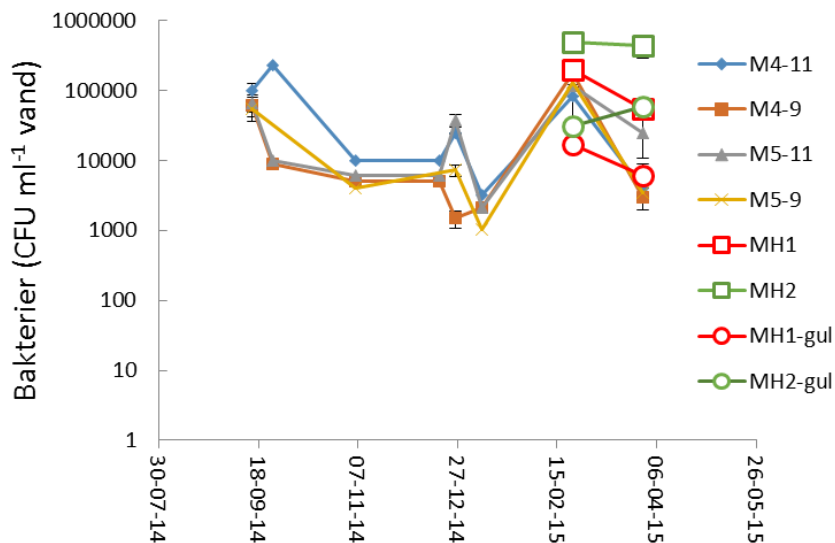
Det kan dog stadig være yderst meningsfuldt, at tilføre nedbryderorganismer, fordi den forurenede vandfase så vil passere gennem et jordvolumen med en relativt tæt population af nedbrydere. Udpladning af sand fra den midterste del af kolonnerne viste, at en stor del af cellerne blev siddende her og stadig var i live (resultater ikke vist).



Figur B.1. Akkumuleret transport af *Sphingomonas herbicidovorans* MH gennem jordkolonner med 2 og 4 cm tykkelse. Værdierne viser gennemsnitsværdier (N=3), bars indikerer SEM).

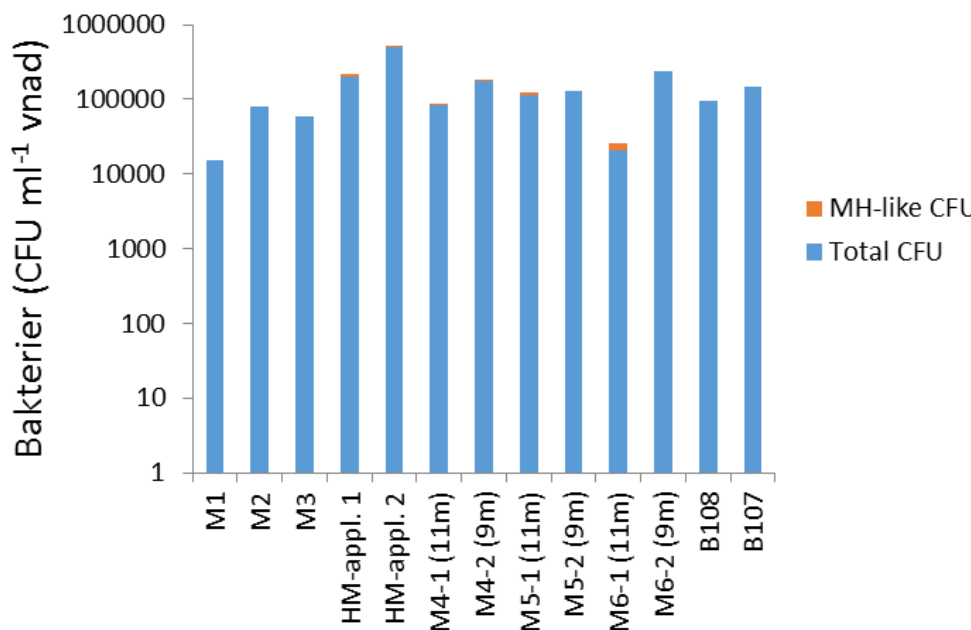
Antal bakterier i jord- og vandprøver

Størrelsen og artssammensætningen af jordens mikrobielle samfund (mikrobiota), har betydning for de økosystemtjenester mikroorganismene leverer – herunder nedbrydning af miljøfremmede organiske kontaminanter. Ved etableringen af feltforsøget, blev det totale antal dyrkbare bakterier (CFU) i 9 jordprøver, udtaget i det øvre sandlag, bestemt til $1,2 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ jord ($\pm 0,2 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ jord; standard pladespredning på R2A medium). Det er et lavt antal CFU'er i forhold til de øverste jordlag, hvor der typisk observeres værdier over 10^9 CFU'er g^{-1} jord – altså 1000 gange flere dyrkbare bakterier. CFU'er blev også bestemt i de fleste af de vandprøver, der rutinemæssigt blev udtaget gennem forsøgsperioden. Figur B.2 viser CFU-niveauet gennem hele forsøget i to af monitoreringsbrøndene i felt-2, samt i de brønde hvor nedbryderbakterierne blev tilført. I Figur B.3 vises CFU'er fra alle brønde i begge felter få uger efter tilførsel af *Sphingomonas herbicidovorans* MH.



Figur B.2. Antal dyrkbare bakterier i vandprøver i M4 og M5 brønde (9 og 11 m dybde) samt i de to brønde (MH-1, MH-2), hvor *Sphingomonas herbicidovorans* MH blev tilført (n=3 i de fleste prøvetagninger, bars indikerer SEM). MH1-gul og MH2-gul indikerer antal CFU'er med en kolonimorfologi der minder om *S. herbicidovorans*.

Den relevante information der kan udtrages fra CFU-resultaterne er, at antallet af CFU i grundvandet er meget lavt; mellem 103 og 105. I vandprøverne hvor *S. herbicidovorans* MH blev tilført var CFU dog 2-3 gang højere end i brøndene uden tilførsel af bakterier (og delvist en konsekvens heraf). Det skal bemærkes, at CFU'er i sagens natur ikke medregner de ikke-dyrkbare bakterier i jorden. Antallet af disse kan godt være 10-100 gang højere end de dyrkbare (Johansen et al., 2005) i almindelig topjord, omend der ikke findes så mange data for dybereliggende jordlag (Taylor et al., 2002). Konsekvensen af de lave bakterietætheder, og det meget homogene og statiske miljø i sandlaget, er under alle omstændigheder, at man vil forvente at måle en relativt lav diversitet. En lav diversitet (taksonomisk såvel som funktionel) vil sandsynligvis have en negativ konsekvens for den naturlige mikrobiotas evne til at nedbryde miljøfremmede organiske mikrokontaminanter. For at en biologisk nedbrydning af dichlorprop kan finde sted, er det nødvendigt, at der er bakterier i jorden, der kan producere de enzymer, der er nødvendige for at nedbrydningsprocessen kan forløbe. De målte lave CFU-værdier indikerer, at sandsynligheden for at dette kriterie er opfyldt i Skelstoftejorden er relativt begrænset.



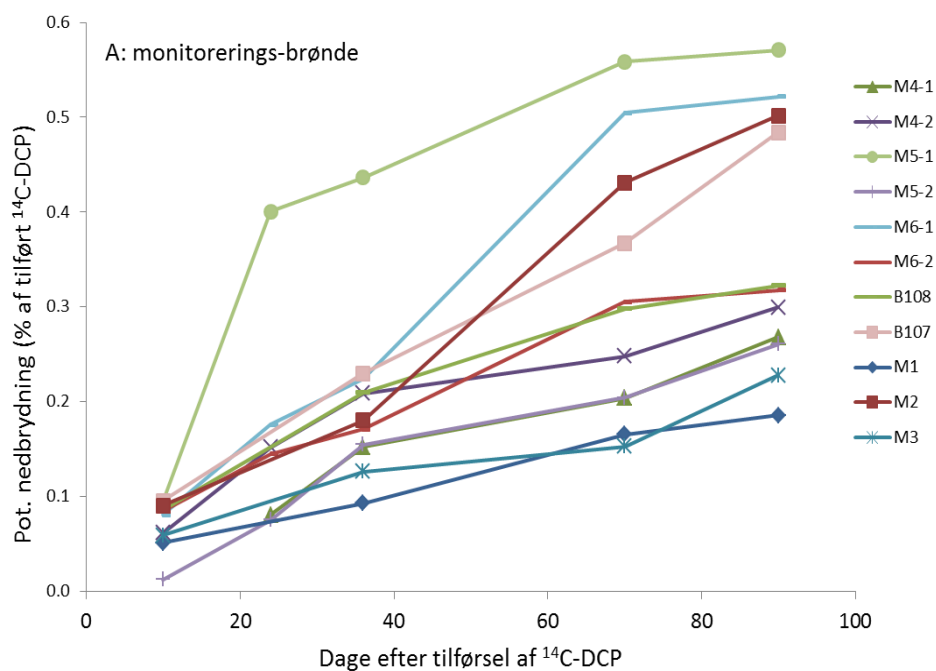
Figur B.3. Antal dyrkbare bakterier i vandprøver fra alle brønde (begge felter) tre uger efter tilførsel af *S. herbicidovorans* MH (n=2).

Potentiel nedbrydning af dichlorprop i vandprøver

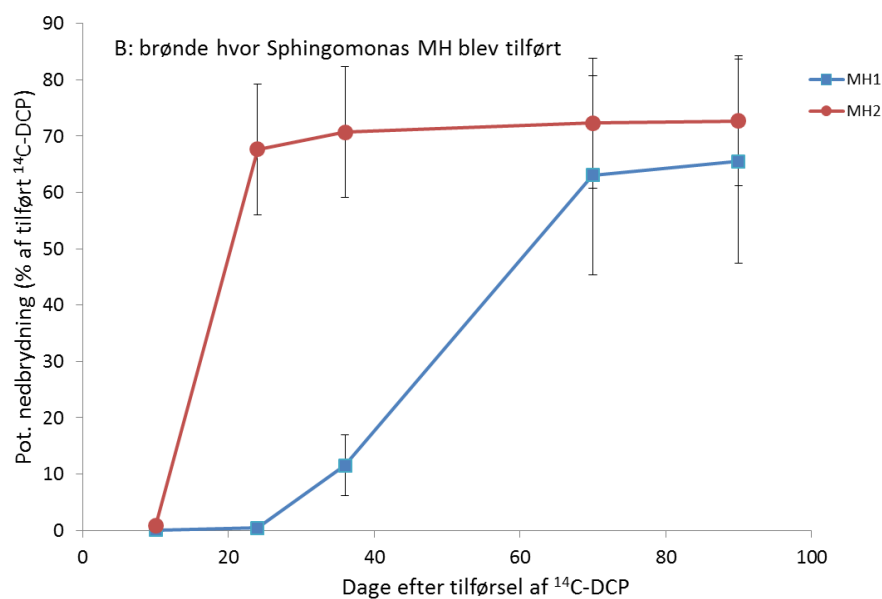
For at biologisk nedbrydning af pesticider (fx dichlorprop) kan finde sted, er det nødvendigt, at der i det naturligt forekommende mikrobielle samfund findes mikroorganismer, der kan producere de enzymer, der er nødvendige for den biokemiske nedbrydning. Man kan få en god indikation for om dette er tilfældet på en kontamineret lokalitet, ved at tilføre ¹⁴C-mærket pesticid til jord- eller vandprøver udtaget på stedet. Hvis der er bakterier eller svampe i prøven, der er i stand til at nedbryde pesticidet fuldstændigt (mineralisering), vil de producere CO₂, der indeholder ¹⁴C fra det mærkede pesticid. Dette kan opsamles i en CO₂-fælde (1M NaOH), og ¹⁴C aktiviteten måles vha. skintillationstælling, og direkte relateres til mængden af mineralise-

ret pesticid som funktion af tid (REF). Aktuelt blev der udtaget vandprøver fra alle monitoreringsbrøndene på Skelstofte i efteråret 2014. Prøverne (5 ml) blev inkuberet i lukkede glasflasker i en 1:1 blanding med R2B medium spiket med ^{14}C -mærket dichlorprop. Mineralisering af dichlorprop blev målt jævnlige over en periode af 6 måneder, hvor der ikke kunne måles ^{14}C i CO_2 -fælderne (data ikke vist). Dette resultat indikerer derfor, at jorden på feltet ikke indeholder naturligt forekommende mikroorganismer, der kan nedbryde dichlorprop under tilstedeværelse af ilt.

Efter tilførsel af *Sphingomonas herbidovorans* MH, blev der atter taget prøver ud fra monitoreringsbrøndene, såvel som fra de brønde, hvor tilførslen af bakterierne fandt sted. Potentiel mineralisering blev målt i prøverne (udtaget 23.2.2015 samt d. 30.3.2015), som beskrevet ovenfor. I Figur B.4 kan det ses, at der ikke blev målt dichlorprop-mineralisering, i monitoreringsbrøndene, i nævneværdig grad idet ingen af prøverne viste et signifikant genfund af ^{14}C (<0,5 % af oprindelige tilsatte ^{14}C -mærkede dichlorprop). I modsætning hertil, var der høje mineraliseringsrater i prøverne fra de to brønde, hvor *Sphingomonas herbidovorans* MH var tilført (Figur B.5). I dette tilfælde blev hovedparten (60-70%) af det tilførte dichlorprop mineraliseret.



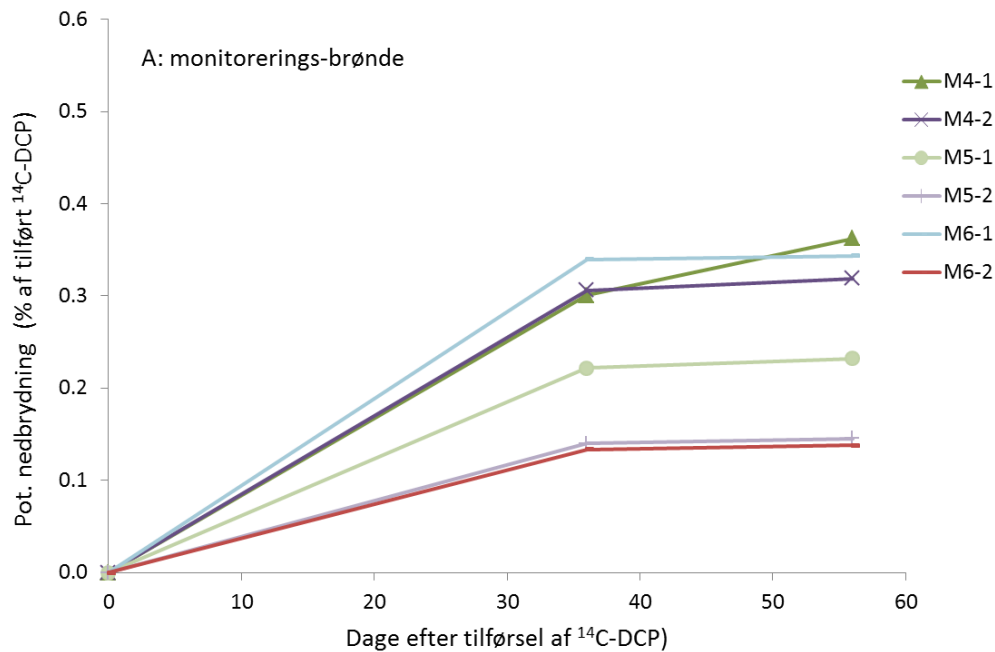
Figur B.4 Potentiel mineralisering i vandprøver udtaget (23.2.2015) i monitoreringsbrønde. Der kunne ikke måles en signifikant mineralisering gennem en tre-måneders periode (n=3; SEM ikke angivet).



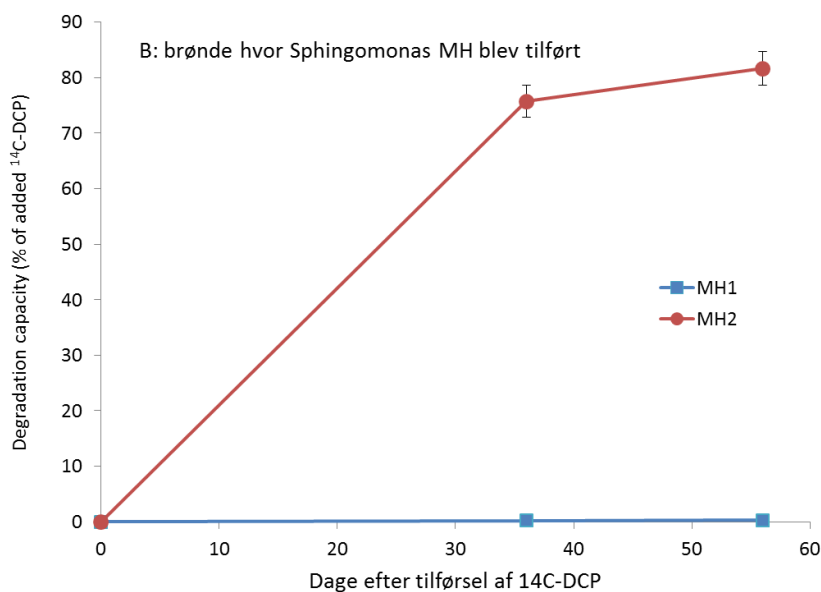
Figur B.5. Potentiel mineralisering i vandprøver udtaget (23.2.2015) i de brønde hvor *Sphingomonas herbidovorans* MH blev tilført. Høje mineraliseringsrater blev detekteret efter få uger (n=3; streger angiver SEM).

Sammenlignelige resultater blev opnået ved en senere prøveudtagning (30.3.2015). Op til 85 % af det tilførte ¹⁴C-DCP blev mineraliseret efter 2 måneder i den ene af brøndene (MH2), mens der ikke mere kunne detekteres mineraliserings-aktivitet i den anden tilførsels-brønd (Figur B.7). I lighed med prøvetagningen den 23.2.2015, kunne der ikke måles signifikant mineralisering i monitoreringsbrøndene (Figur B.6). Samlet indikerer resultaterne fra begge prøveudtagningerne, at der ikke er mikroorganismer blandt den naturlige mikrobiota, der er i stand til at nedbryde dichlorprop.

Det synes nødvendigt, at tilføre en specifik nedbryder organisme, som *Sphingomonas herbidovorans* MH, for at få nedbrydningsprocessen i gang. Ved den sidste prøveudtagning (30.3.2015) var der kun nedbrydningsaktivitet tilbage i en af MH-brøndene og det må antages, at niveauet af *Sphingomonas herbidovorans* MH er blevet så lille, at DCP-mineralisering er ophørt. Det kan ikke udelukkes, at *Sphingomonas herbidovorans* MH er blevet de-lokaliseret af vandstrømme i sandet og derfor ikke mere forefindes i de vandprøver det udtages fra brønden. Men det er erfaringen fra tidligere sammenlignelige forsøg, at introducerede bakterier ofte har en kort overlevelse når de udsættes i miljøet pga. dårlig tilpasning til de aktuelle levekår samt græsning fra predatorer.



Figur B.6. Potentiel mineralisering i vandprøver udtaget (30.3.2015) i monitoreringsbrønde. Der kunne ikke måles en signifikant mineralisering gennem en tre-måneders periode (n=3; SEM ikke angivet).



Figur B.7. Potentiel mineralisering i vandprøver udtaget (30.3.2015) i de brønde hvor *Sphingomonas herbicidovorans* MH blev tilført. Høje mineraliseringsrater blev detekteret (n=3; streger angiver SEM).

Produktion af inokulum til udsætning på Skelstofte

Valget af *Sphingomonas herbicidovorans* MH til udsætning på det kontaminerede site på Skelstofte, blev truffet ud fra litteraturen, hvor dette bakterieisolat er forholdsmæssigt godt karakteriseret i en række videnskabelige publikationer. *Sphingomonas herbicidovorans* MH kan producere enzymer, der muliggør aerob nedbrydning af flere typer phenoxysyrer, som bakterien sandsynligvis anvender som kulstofkilde. Antallet af bakterier, der skulle tilføres jorden på Skelstofte, blev beregnet ud fra et estimeret jordvolumen på ca. 1,5 m³, der indeholder ca. 400 liter jordvand. Det betyder, at der skulle tilsættes ca. 10¹³ bakterier for at opnå en

bakteriel tæthed på ca. 10^8 ml⁻¹ jordvand. Kort beskrevet, en overnats-kultur af *Sphingomonas herbicidovorans* MH startet på basis af en enkeltkoloni.

Prækulturen blev inokuleret i en større mængde R2B medie der blev dyrket til sen stationær fase. Herefter blev cellerne centrifugeret ned og resuspenderet i 1 liter 0,1 PBS. Cellerne blev holdt på is og umiddelbart efter transporteret til Skelstofte og tilført til jorden ligeligt fordelt gennem de to tilsætningsbrønde (MH1 og MH2, også kaldt B1 og B2). Figur B.8 viser en flaske med de karakteristiske orange-gule *Sphingomonas herbicidovorans* MH-celler, lige før tilførslen den 3.2.2015. Ved begge tilførsler blev inokulatet kvalitetskontrolleret ved at køre et overnats potentielt mineraliserings assay på 0,1 ml af inokulum. Dette check mislykkes ved første tilførsel (19.12.2014), fordi flasken væltede, så der trængte NaOH ud i kulturen, hvilket ødelagde den øjeblikkeligt. For at fjerne enhver tvivl om kvaliteten af inokulum, blev der derfor gennemført endnu en *Sphingomonas herbicidovorans* MH tilførsel (3.2.2015) på lokaliteten. Her viste kvalitetstjekket, at inokulumskulturen mineraliserede ca. 8 % af det tilgængelige ¹⁴C-DCP i et overnatsassay, hvilket betyder at kulturen bestod af det rette bakterieisolat, der også var i stand til at nedbryde dichlorprop helt til CO₂.



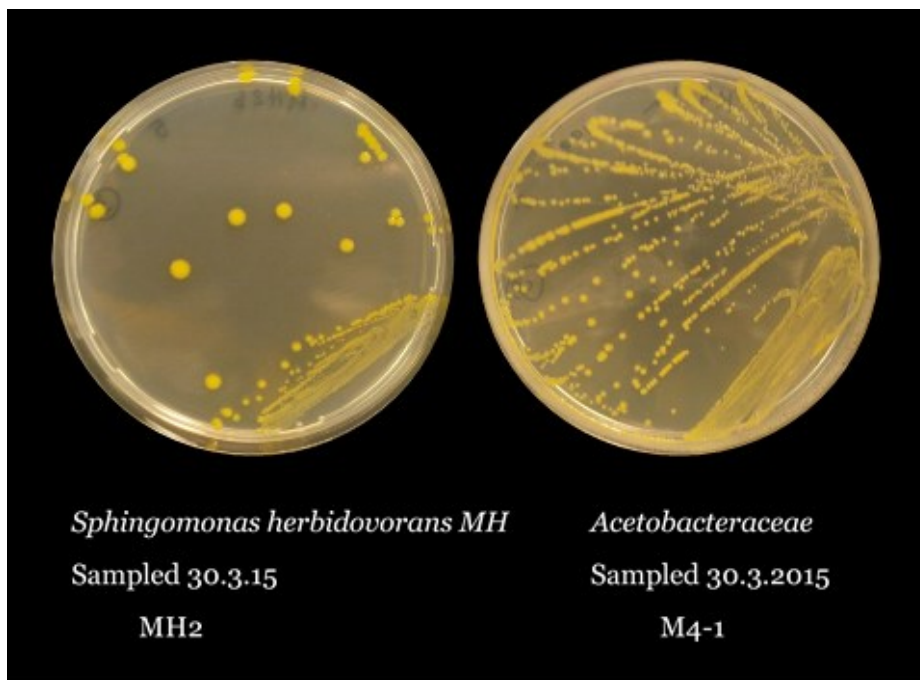
Figur B.8. Flaske med af *Sphingomonas herbicidovorans* MH, klar til at blive tilført jorden i 9 meters dybde på Skelstofte d. 3.2.2015.

Overlevelsen og mulig udbredelse af den tilførte *Sphingomonas herbicidovorans* MH blev fulgt ved tage vandprøver i alle monitoreringsbrønde samt i de to brønde, hvor den blev tilført. Det totale antal dyrkbare bakterier (CFU) blev estimeret efter spredning af passende fortyndinger (0,1 PBS) af vandprøverne på TSA og R2A medium, som beskrevet ovenfor. Bakteriel diversitet samt og spredning og overlevelse af *Sphingomonas herbicidovorans* MH på lokaliteten

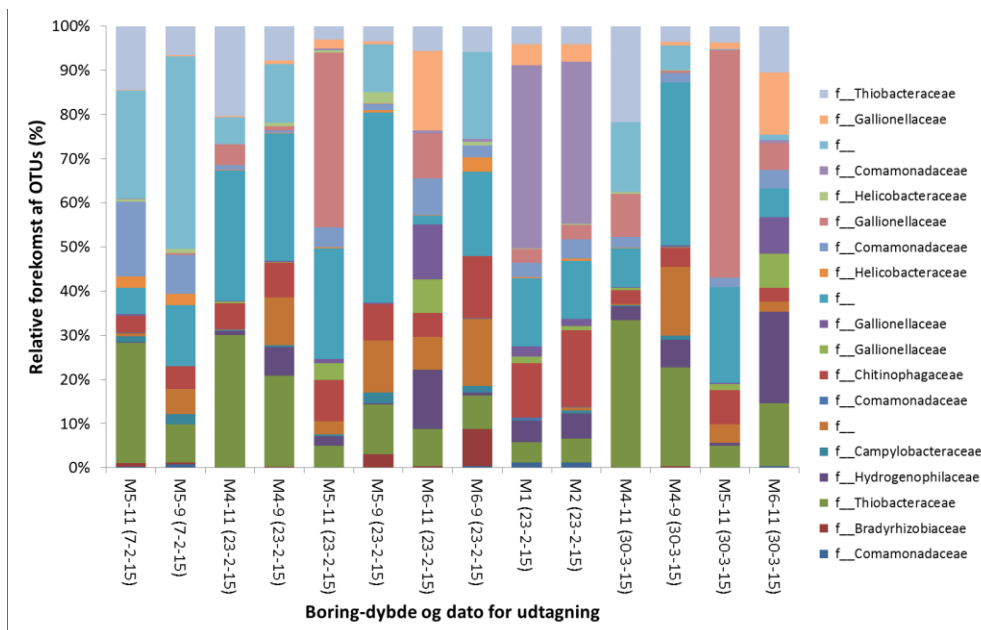
Det var projektets intention at karakterisere det mikrobielle samfund på lokaliteten gennem hele testperioden. Derfor blev der taget vandprøver ud fra alle brøndene og til forskellige tidspunkter.

Vandprøverne blev udtaget og filtreret gennem 0,2 µm Sterivex filtre, mhp. senere ekstraktion af DNA til analyse af diversiteten af det mikrobielle samfunds vha. 16S sekventering samt evt. tilstedeværelse af den tilførte *Sphingomonas herbidovorans MH*. Filtrene blev præserveret med RNAlater, for at sikre bevarelse af DNA/RNA, og gemt til senere analyse. DNA blev ekstraheret med MOBIO PowerWater® Sterivex™ DNA isolation kit (MoBio Inc. Carlsbad, CA, USA) og efterfølgende blev bakterielle 16S gener amplificeret med PCR for efterfølgende sekventering på Illumina MiSeq platformen (Illumina Inc, CA, USA). Sekventeringsdata blev behandlet med UPARSE (Edgar, 2013) og QIIME (Caporaso et al., 2010). Ved de første tre prøvetagninger blev der filtreret 900 ml vandprøve, direkte på lokaliteten. Men det viste sig problematisk, fordi mængden af DNA efterfølgende viste sig at være så lav, at der ikke kunne amplificeres tilstrækkeligt DNA ved den indledende PCR proces, til at sekventering kunne gennemføres. Derfor blev det besluttet, at udtage 10-L prøver og filtrere dem under laboratorieforhold (men ellers som beskrevet som for de første prøver). Den lave mængde DNA hænger sammen med det meget lave antal bakterier i prøverne (se Figur B.2). Derfor kunne der kun etableres brugbare 16S DNA-profiler for vandprøver fra de sidste tre prøveudtagninger. Det ekstraherede DNA fra monitoreringsbrøndene blev sekventeret til to formål; mulig genfindning af DNA sekvens svarende til *Sphingomonas herbidovorans MH* DNA, samt karakterisering af samfundsstrukturen i den naturligt forekommende mikrobiota. Resultaterne herfra viste, at det ikke var muligt, at detektere *Sphingomonas herbidovorans MH* i ekstrakterne fra nogen af monitoreringsbrøndene i forsøgsfelt 2. Dette er også i overensstemmelse med resultaterne for den potentielle mineralisering af dichlorprop, hvor der ikke kunne detekteres nedbrydning af dichlorprop i nogen af monitoreringsbrøndene.

Det totale antal dyrkbare bakterier blev bestemt fra vandprøver udtaget gennem hele forsøgsperioden (Fig. 2) og kolonier der morfologisk matchede *Sphingomonas herbidovorans MH* blev udtaget fra pladerne og gemt for senere afklaring, om de faktisk var identisk med det udsatte MH-isolat. I alt blev 10 af disse isolaters 16S DNA analyseret for sammenhold med den tilsvarende sekvens i *Sphingomonas herbidovorans MH*. Ud af de undersøgte isolater var der to, der matchede med *Sphingomonas herbidovorans MH*, mens de resterende 8 isolater tilhørte andre bakteriearter (Fig. 9). Begge de to genfundne *Sphingomonas herbidovorans MH* blev fundet i vandprøver fra de brønde, hvor de var tilført, mens *Sphingomonas herbidovorans MH* ikke blev fundet i vandprøver fra monitoreringsbrønde.



Figur B.9. eksempel på to bakterier isoleret Skelstoft: *Spingomonas herbidovorans* MH fra brønd MH2 (tilførsel), samt *Acetobacteraceae* fra brønd M4-1. De pågældende arter er isoleret fra prøver udtaget 55 dage efter sidste tilførsel af *Spingomonas herbidovorans* MH. 16S sekventering blev anvendt ved identifikation.



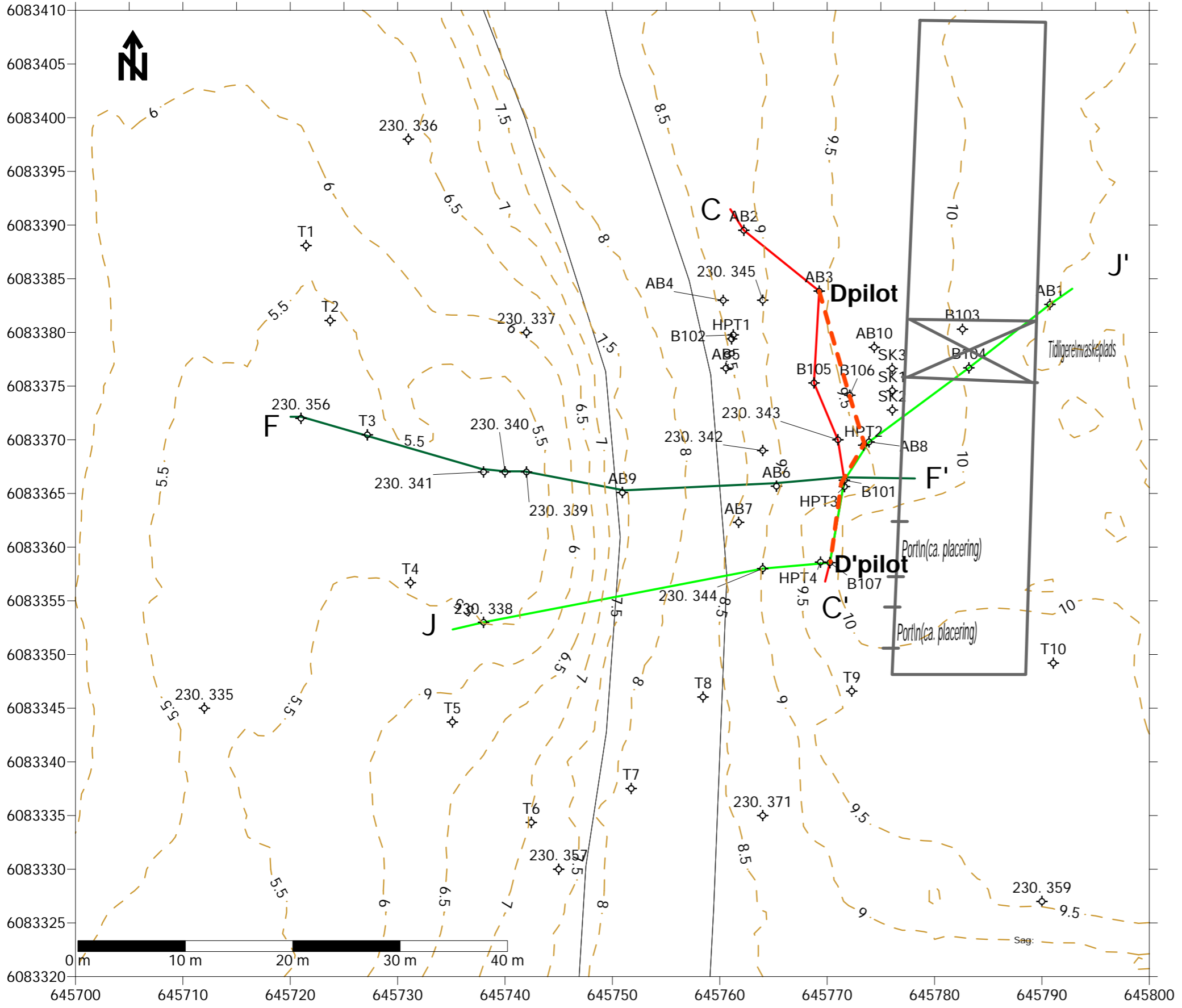
Figur B.10 Relativ forekomst af bakterielle OTUer (taksonomiske enheder svarende til en art) i vandprøver fra de forskellige brønde på Skelstoft. De angivne OTUer repræsenterer de dominerende arter, der tilsammen udgør 99% af de OTUer der findes i det mikrobielle samfund i grundvandet.

I alt betyder det, at *Spingomonas herbidovorans* MH ikke blev transporteret i jorden (uanset dybde) – i hvert fald ikke i et omfang, der kunne distribuere dem til den nærmeste monitoreringsbrønd (M4), der ligger ca. en halv meter fra de brønde, hvor bakterierne blev tilført. På den anden side kunne der altså detekteres dyrkbare *Spingomonas herbidovorans* MH 55 dage efter tilførsel – men kun i de brønde, hvor de var blevet tilført. Dette resultat hænger fint

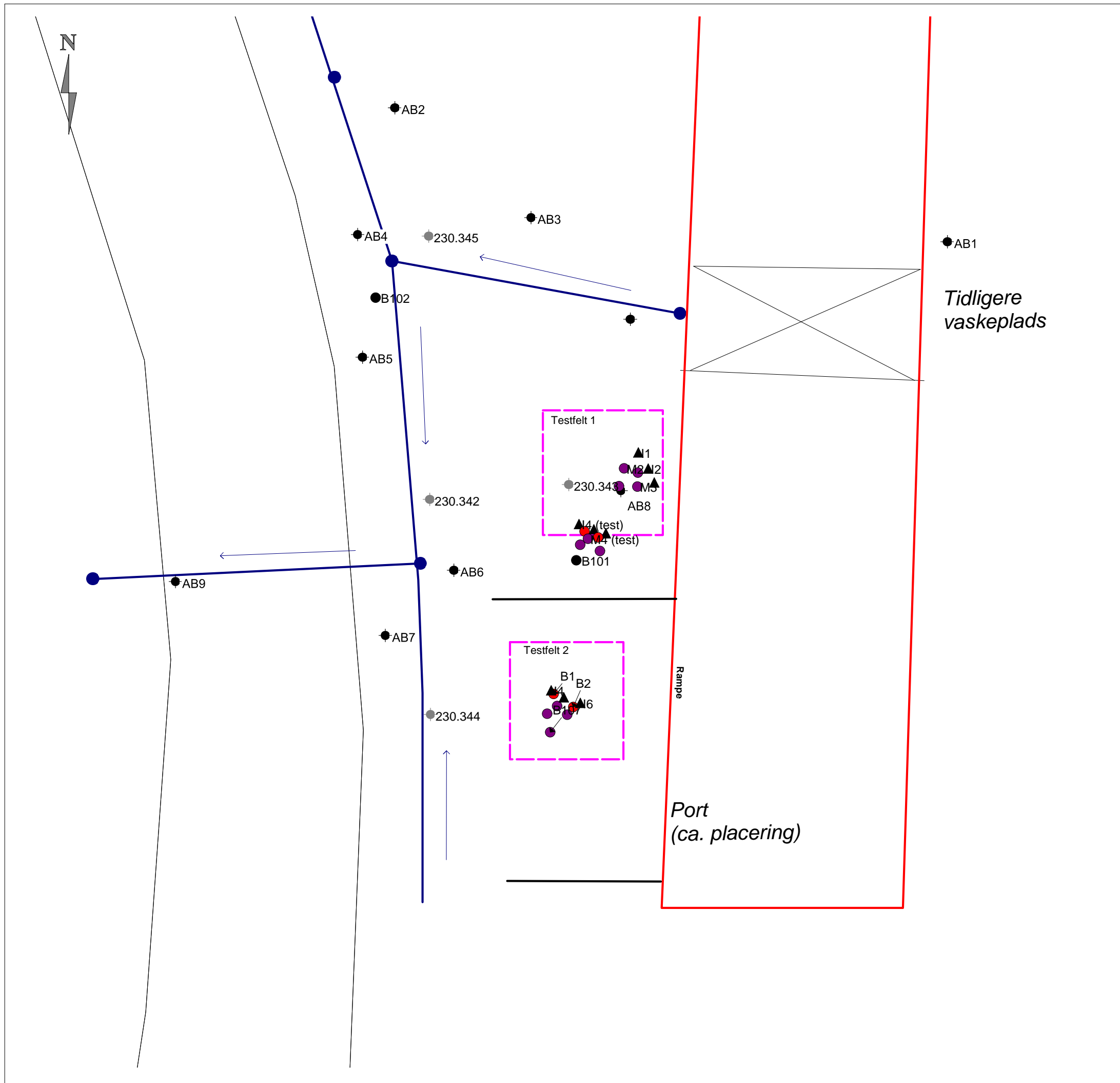
sammen med, at der netop i disse brønde også kunne måles potentiel mineralisering af ^{14}C -dichlorprop.

Vdr. Information om den samfundsstrukturen af den naturligt forekommende mikrobiota i grundvandet, så viste 16S sekventeringen, at det mikrobielle samfund var meget artsfattigt; uanset i hvilke brønde prøverne blev udtaget. De dominerende arter (tilsammen 99% af detekterede OTUer) udgjordes af højst 20 arter (Fig. B.10), hvilket tyder på et artsfattigt samfund, generelt. Det kan spekuleres, om den lave artsdiversitet også gør det mere usandsynligt, at der, fra starten, har været bakterier tilstede, der er i stand til at nedbryde dichlorprop. Hvis det er tilfældet, synes det nødvendigt, at tilføre bakterier der både besidder sådanne nedbrydgener og er i stand til at udtrykke dem in situ. Ud fra resultaterne i dette feltstudie, ser det ud til at *Sphingomonas herbicidovorans* MH har sådanne egenskaber og er i stand til at overleve i længere perioder (måneder). Det er dog nødvendigt, at sikre den spatiale spredning i jord bedre, end var tilfældet i indeværende forsøg.

Bilag C Situationsplaner



Projektering i kildeområde ved Skelstofte					
Placering af tværsnit				Målforhold: 1: 400	Kotesystem: DVR90
Tegner: KATS	Kontrol: SARO	Godkendt: NTUX	Sagsnummer: 3641200162	Dato: 18-02-2016	Bilag nr.: C
Orbicon A/S		Ringstedvej 20 4000 Roskilde	Tlf. 46 30 03 10 Fax 46 30 03 11	www.orbicon.dk mail@orbicon.dk	



Signaturforklaring

- Bygning
- Tidligere vaskeplads
- Brønd
- Rørledning
- Boringer fra 2009, sløjfede
- Boringer fra 2009
- Boringer fra 2011
- Nyetableret afværgeboring (2012)
- Boringer fra 2012
- Boringer fra 2013
- HPT sonderinger 2013
- SK1-SK3: Boringer, skrå (30°) med 2 filtre
- Injektionsboring
- Monitoringsboring
- Bakteieinjektion

Projektering i kildeområdet ved Skelstoft



Situationsplan. placering af boringer				1:200	Relativt
GITS	KATS	SARO	3641200162	18.02.2016	C
Orbicon		Ringstedvej 20 4000 Roskilde	Tlf.: 46300310 Fax: 46300311	www.orbicon.dk mail@orbicon.dk	

Bilag D Analyseresultater for pesticider i testfelt 1

Felt	Boring- filter	Dato	2,4-D	2,6- dichlorb enzamid (BAM)	2-CPP	4-CPP	4- nitrophe nol	Atrazin	Bentazo n	Desethyl atrazin	Desethylt erbutylaz in	Desisopr oplatraz in	Dichlorpr n	Dinoseb	Hexazino n	Hydroxy atrazin	Isoprotur on	MCPA	Mechlorp rop	Simazin	Terbutyla zin	Metribuzi n- desamin o-diketo	Metribuzi n-diketo	4-chlor-2- methylph enol	2,4- dichlorp henol	2,6- dichlorp henol
Testfelt 1	AB8-1	03-08-2012	<0,01	2,2	0,97	5,3	<0,02	<0,01	2,4	<0,01	<0,01	<0,01	65	0,018	2,5	<0,01	<0,01	7,1	0,14	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,048	0,298	0,027
Testfelt 1	AB8-1	06-03-2014	<0,01	0,77		1,9	<0,01	<0,01	20	<0,01	<0,01	<0,01	>200 **	<0,01	>10 **	<0,01	<0,01	6,7	0,092	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,1	0,18	0,024
Testfelt 1	AB8-2	03-08-2012	<0,01	1,7	0,092	1,5	<0,02	0,059	1,2	0,034	0,15	0,069	15	<0,01	1,2	<0,01	<0,01	1,2	0,036	0,017	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,082	0,016
Testfelt 1	AB8-2	06-03-2014	<0,01	0,64		<0,01	0,053	0,4	0,2	0,08	0,99	0,2	0,22	0,22	0,41	0,011	0,037	0,015	<0,01	0,13	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Testfelt 1	B108	27-05-2014	<0,01	3,8		0,72	<0,01	<0,01	<10	<0,01	0,014	0,01	18	<0,01	12,3	<0,01	<0,01	1,3	0,031	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,036	<0,01
Testfelt 1	B108	12-08-2014	<0,01	4,4	0,03	0,51	<0,01	<0,01	2,7	<0,01	0,023	<0,01	17	<0,01	8,6	<0,01	<0,01	1,6	0,04	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	0,013	0,025	0,01
Testfelt 1	B108	10-09-2014	<0,01	4,6	<0,02	0,059	0,26	0,062	0,77	0,027	0,15	0,043	1,2	<0,01	5	<0,01	<0,01	0,16	<0,01	0,016	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	0,025	<0,02
Testfelt 1	B108	13-11-2014	<0,01	4,2	<0,01	0,069	<0,01	0,079	0,41	0,031	0,21	0,066	1,4	<0,01	4,8	<0,01	<0,01	0,42	<0,01	0,018	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01
Testfelt 1	B108	19-12-2014	<0,01	7,2	<0,01	0,19	<0,01	0,074	0,41	0,028	19	0,064	2,8	<0,01	5	<0,01	<0,01	1,9	0,018	0,014	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	0,011	<0,01
Testfelt 1	B108	08-01-2015	<0,01	1	<0,01	<0,01	<0,01	0,064	0,55	0,027	0,18	0,052	1,1	<0,01	5,7	<0,01	<0,01	0,071	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	0,014	<0,01
Testfelt 1	B108	24-02-2015	<0,01	4,5	**	0,011	<0,01	0,059	0,42	0,026	0,14	0,046	0,29	<0,01	4,2	<0,01	<0,01	0,039	<0,01	0,012	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	0,013	<0,01
Testfelt 1	B108	25-03-2015	<0,01	5,3		0,18	<0,01	0,056	0,69	0,018	0,2	0,039	1,9	<0,01	3,2	<0,01	<0,01	0,15	<0,01	0,012	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,011	<0,01
Testfelt 1	B108	13-05-2015	<0,01	7		0,039	<0,01	0,061	0,49	0,02	0,18	0,043	0,5	<0,01	2,1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,014	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,1
Testfelt 1	M1	10-09-2014	<0,01	2,5	<0,02	0,41	<0,01	0,025	1,8	0,022	0,045	0,029	7,7	<0,01	10	0,016	<0,01	0,65	0,051	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	0,075	<0,02
Testfelt 1	M1	13-11-2014	<0,01	1,9	<0,01	0,62	<0,01	0,03	0,39	0,033	0,074	0,056	9,1	<0,01	4,3	<0,01	<0,01	2,6	0,041	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,014	0,022	<0,01
Testfelt 1	M1	19-12-2014	<0,01	2,4	<0,01	1,3	<0,01	0,032	0,38	0,049	0,1	0,059	12	<0,01	3,1	<0,01	<0,01	7,2	0,042	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01
Testfelt 1	M1	08-01-2015	<0,01	0,78	<0,01	0,15	<0,01	0,036	0,52	0,048	0,13	0,048	11	<0,01	3,8	<0,01	<0,01	0,39	0,11	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01
Testfelt 1	M1	24-02-2015	<0,01	2	**	0,26	<0,01	0,027	0,5	0,052	0,1	0,081	6,3	<0,01	2,9	<0,01	<0,01	0,53	0,014	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,01	0,01	<0,01
Testfelt 1	M1	25-03-2015	<0,01	2,2		0,34	<0,01	0,021	1	0,031	0,11	0,045	4,8	<0,01	2,9	<0,01	<0,01	0,34	0,013	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,014	0,028	<0,01
Testfelt 1	M1	13-05-2015	<0,01	2		0,015	<0,01	0,032	0,61	0,031	0,11	0,049	0,78	<0,01	2	<0,01	<0,01	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,027	<0,01
Testfelt 1	M2	10-09-2014	<0,01	3,4	<0,02	1,7	<0,01	0,026	2,6	0,01	0,037	0,067	40	<0,01	11	0,017	<0,01	3,6	0,076	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,02	0,04	0,031
Testfelt 1	M2	13-11-2014	<0,01	3,7	<0,01	5,3	<0,01	<0,01	1,2	<0,01	<0,01	0,01	100	<0,01	12	<0,01	<0,01	25	0,12	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,49	0,38	0,025
Testfelt 1	M2	19-12-2014	<0,01	3	<0,01	4,3	<0,01	<0,01	0,84	<0,01	<0,01	<0,01	70	<0,01	6,2	<0,01	<0,01	26	0,15	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,32	0,073	0,01
Testfelt 1	M2	08-01-2015	<0,01	0,18	<0,01	0,015	<0,01	<0,01	0,026	<0,01	<0,01	<0,01	1,3	<0,01	0,49	<0,01	<0,01	0,023	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,039	<0,01	<0,01
Testfelt 1	M2	24-02-2015	<0,01	2	**	0,3	<0,01	<0,01	0,81	<0,01	<0,01	0,061	15	<0,01	6,6	<0,01	<0,01	1,2	0,03	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,42	0,05	0,013
Testfelt 1	M2	25-03-2015	<0,01	2,6		0,5	<0,01	<0,01	1,8	<0,01	0,011	<0,01	13	<0,01	6,8	<0,01	<0,01	1,1	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,34	0,085	0,016
Testfelt 1	M2	13-05-2015	<0,01	2,4		0,38	<0,01	<0,01	1,4	<0,01	<0,01	<0,01	12	<0,01	4,7	<0,01	<0,01	0,87	0,018	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,26	0,076	<0,01
Testfelt 1	M3	10-09-2014	<0,01	3,2	<0,02	0,13	<0,01	0,1	0,54	0,087	0,24	0,13	2,5	<0,01	1,5	<0,01	<0,01	0,31	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	0,022	<0,02
Testfelt 1	M3	13-11-2014	<0,01	3,6	<0,01	0,044	<0,01	0,14	0,23	0,082	0,38	0,15	1,1	<0,01	0,75	<0,01	<0,01	0,78	<0,01	0,014	<0,01	<0,02	<0,02	0,017	<0,01	<0,01
Testfelt 1	M3	19-12-2014	<0,01	3,6	<0,01	0,06	<0,01	0,11	0,1	0,066	0,28	0,093	1,1	<0,01	0,37	<0,01	<0,01	1,3	<0,01	0,01	<0,01	<0,02	<0,02	0,011	<0,01	<0,01
Testfelt 1	M3	08-01-2015	<0,01	0,82	<0,01	<0,01	<0,01	0,072	0,11	0,048	0,19	0,082	0,38	<0,01	0,3	<0,01	<0,01	0,019	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01
Testfelt 1	M3	24-02-2015	<0,01	0,89	**	<0,01	<0,01	0,16	0,26	0,098	0,38	0,15	0,2	<0,01	0,62	<0,01	0,013	0,038	<0,01	0,02	<0,01	<0,02	<0,02	0,015	0,017	<0,01
Testfelt 1	M3	25-03-2015	<0,01	4,5		<0,01	<0,01	0,13	0,47	0,067	0,31	0,11	0,13	<0,01	0,54	<0,01	<0,01	0,027	<0,01	0,016	<0,01	<0,01	<0,01	0,012	<0,01	<0,01
Testfelt 1	M3	13-05-2015	<0,01	3,8		<0,01	<0,01	0,12	0,39	0,056	0,3	0,094	0,053	<0,01	0,41	<0,01	<0,01	0,015	<0,01	0,013	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,016	<0,01

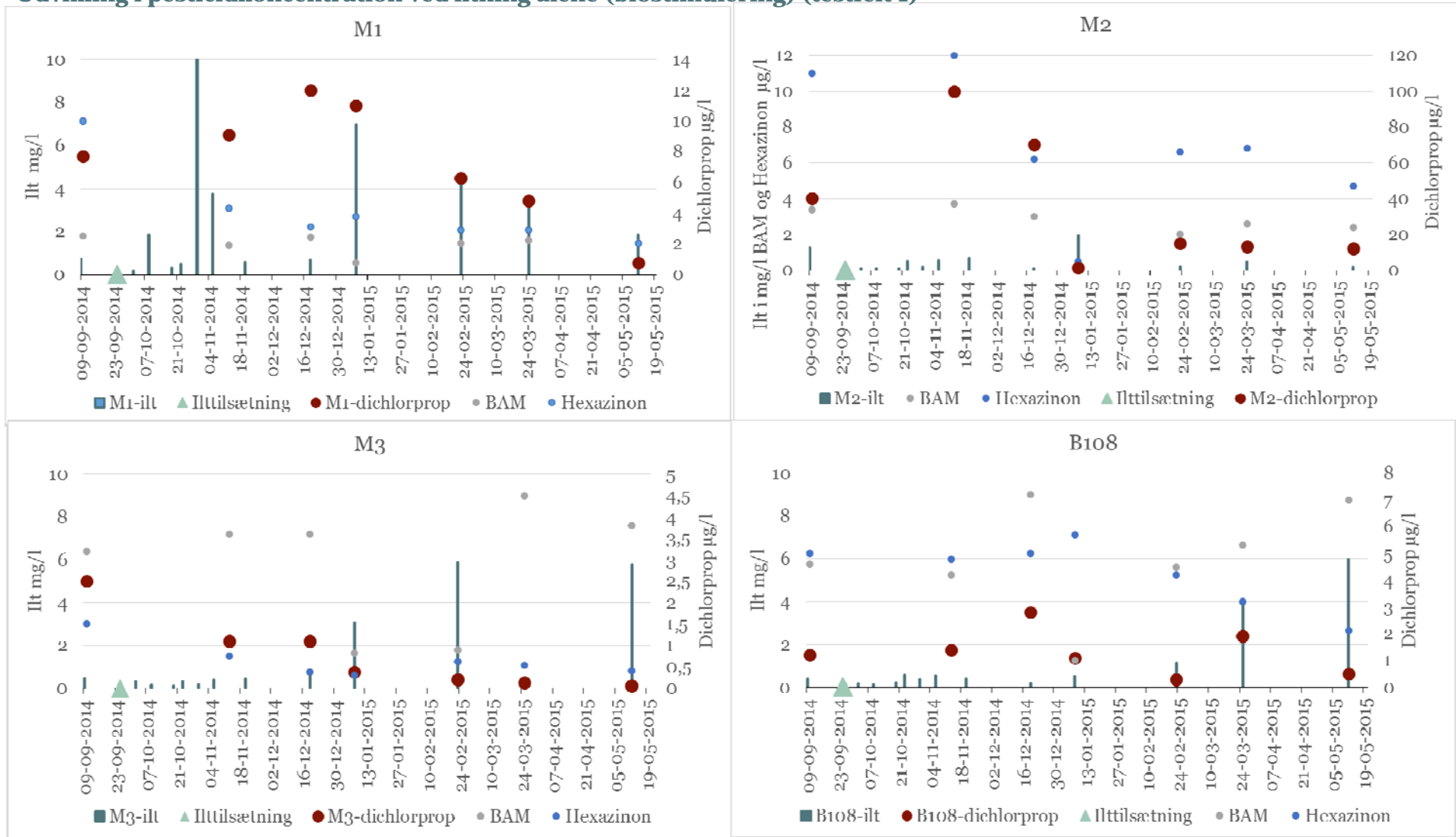
Testfelt 2	M6-2	13-11-2014	<0,01	2,7	<0,01	<0,01	<0,01	0,24	0,019	0,1	0,47	0,17	0,046	<0,01	0,2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,056	<0,01	<0,02	<0,02	<0,01	0,019	<0,01
Testfelt 2	M6-2	19-12-2014	<0,01	**	<0,01	0,11	<0,01	0,26	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,067	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,012	<0,02	<0,02	<0,01	0,011	<0,01
Testfelt 2	M6-2	08-01-2015	<0,01	0,87	<0,01	<0,01	<0,01	0,28	0,017	0,13	0,53	0,21	<0,01	<0,01	0,26	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,071	0,013	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	0,011
Testfelt 2	M6-2	24-02-2015	<0,01	0,77	**	<0,01	<0,01	0,27	0,01	0,1	0,41	0,19	<0,01	<0,01	0,21	<0,01	0,012	<0,01	<0,01	0,068	0,011	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01
Testfelt 2	M6-2	25-03-2015	<0,01	2,3		<0,01	<0,01	0,2	0,042	0,068	0,3	0,13	<0,01	<0,01	0,21	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,054	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Testfelt 2	M6-2	13-05-2015	<0,01	2,2		<0,01	<0,01	0,18	0,045	0,056	0,27	0,099	<0,01	<0,01	0,17	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,046	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,021	<0,01

Bilag D Analyseresultater for redoxparametre

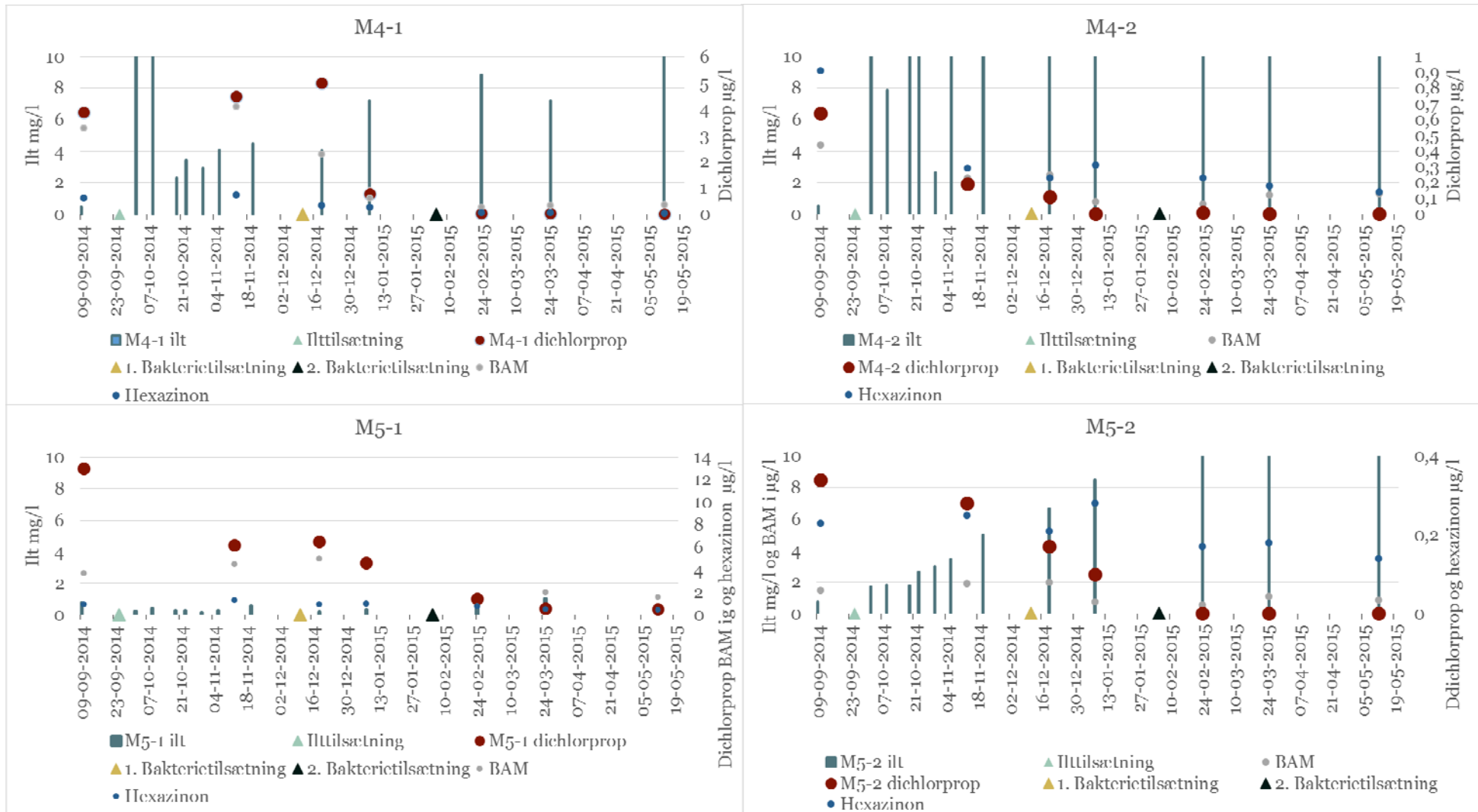
Felt	Boring-filter	Dato	pH	Ledningsevne, 25°C	Ledningsevne målt ved	Ilt	NVOC	Jern	Jern, filt	Mangan	Mangan, filt	Nitrat	Sulfat	Ammonium	Hydrogencarbonat
Testfelt 2	B107-1	25-03-2015	7,3	101	16,4	1,9	1,5	1,3	0,0063	0,12	0,019	45	99	<0,005	440
Testfelt 2	B107-1	10-09-2014	7,2	112	20,5	0,5	1,5	0,076	0,0012	0,098	0,089	100	120	0,017	460
Testfelt 1	AB8-1	06-03-2014						3,5		0,31		<0,1	230		
Testfelt 1	B108	25-03-2015	8	133	17,1	1,6	1,2	0,34	0,011	0,078	0,05	130	81	<0,005	360
Testfelt 1	B108	10-09-2014	7,3	112	19,4	0,6	1,4	0,16	0,013	0,08	0,07	150	69	0,018	400
Testfelt 1	M1	25-03-2015	7,5	154	16,3	3,3	2,2	0,08	0,0033	0,084	0,08	150	210	0,089	420
Testfelt 1	M1	10-09-2014	7,5	182	19,5	0,3	5,1	1,8	1,4	0,073	0,05	0,64	450	0,46	570
Testfelt 1	M2	10-09-2014	7,4	104	19,3	0,2	11	22	2,3	1,1	0,094	<0,1	130	0,13	400
Testfelt 1	M2	25-03-2015	7,5	147	16,6	<0,2	2,2	4,5	2,7	0,18	0,09	2,9	280	0,13	440
Testfelt 1	M3	25-03-2015	7,2	140	16,8	0,72	1,1	0,019	0,0049	0,042	0,037	190	92	<0,005	390
Testfelt 1	M3	10-09-2014	7,3	125	19,3	0,5	1,6	0,34	0,17	0,1	0,1	220	84	0,64	390
Testfelt 2	M4-1	25-03-2015	7,5	156	17,1	9,3	5,4	0,033	0,0075	0,0082	0,0045	24	130	<0,005	530
Testfelt 2	M4-1	10-09-2014	7,3	102	20,3	0,2	1,9	1	0,027	0,2	0,16	41	85	0,38	410
Testfelt 2	M4-2	10-09-2014	7,2	107	20,4	0,4	1,5	0,75	0,015	0,24	0,2	110	65	0,47	440
Testfelt 2	M4-2	25-03-2015	7,3	99	17,3	>10	1,1	0,051	0,0036	0,011	0,0011	52	67	<0,005	410
Testfelt 2	M5-1	10-09-2014	7,3	112	20,7	0,3	1,7	0,55	0,29	0,2	0,19	59	140	0,35	430
Testfelt 2	M5-1	25-03-2015	7,2	123	17,1	0,71	2,2	se bem	se bem	se bem	se bem	30	120	<0,005	460
Testfelt 2	M5-2	10-09-2014	7,3	86,7	20,3	0,6	1,6	0,13	0,015	0,23	0,22	64	44	0,48	400
Testfelt 2	M5-2	25-03-2015	7,3	93,2	17,3	>10	1,2	0,014	0,0017	0,0016	0,0011	58	41	<0,005	390
Testfelt 2	M6-1	10-09-2014	7,3	142	20,2	0,8	2,3	0,72	0,56	0,2	0,2	1,2	250	0,067	480
Testfelt 2	M6-1	25-03-2015	7,7	113	17	3,2	1,7	0,01	0,0036	0,029	0,029	38	160	<0,005	420
Testfelt 2	M6-2	25-03-2015	7,4	93,3	17	>10	1,1	0,016	0,002	0,0014	0,0008	59	45	<0,005	390
Testfelt 2	M6-2	10-09-2014	7,3	91,8	20,2	1,9	1,3	0,049	0,0081	0,13	0,13	84	47	0,014	410

BILAG E

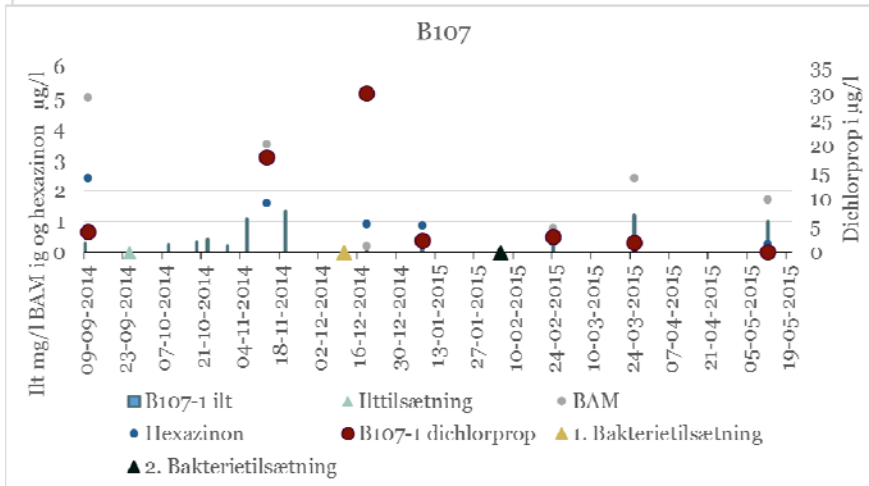
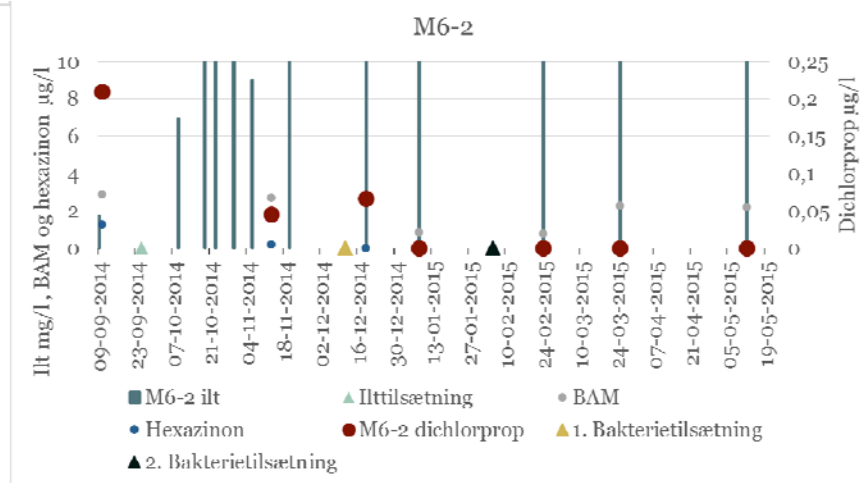
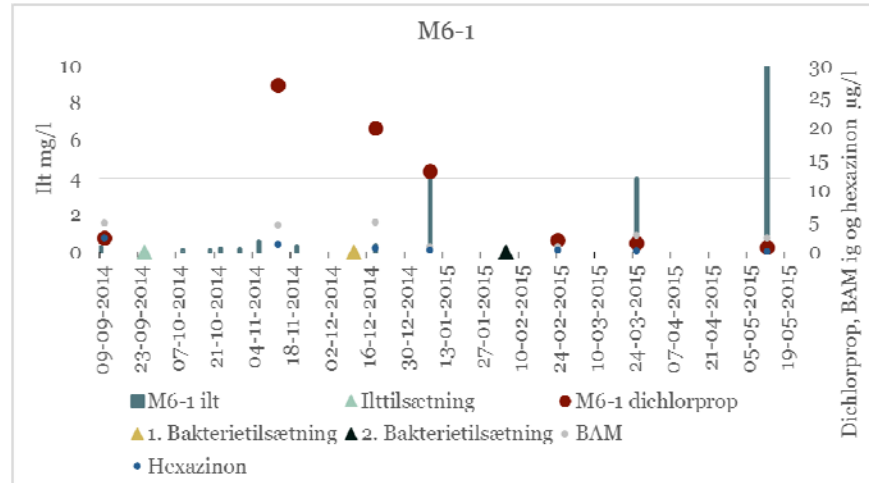
Udvikling i pesticidkoncentration ved iltning alene (biostimulering) (testfelt 1)



Udvikling i pesticidkoncentration ved iltning og bioaugmentering (testfelt 2)



Udvikling i pesticidkoncentration ved iltning og bioaugmentering (testfelt 2)



BILAG F: Opskalering- Økonomi overslag

Post	Honorar	Interne udlæg	Eksterne udlæg	Test	Faktor (se kommentar)	Opskalering
Detailprojektering						
Detailprojektering	kr. 75.000,00			kr. 75.000,00		
Møder	kr. 15.000,00			kr. 15.000,00		
I alt for detailprojektering				kr. 90.000,00	1,5	kr. 135.000,00
Borearbejde, injektionsboringer og monitoringsboringer PL, møder mm	kr. 40.000,00					
Etablering af 6 stk. injektionsboringer inkl. fuldtidstilsyn	kr. 9.000	kr. 1.500	kr. 72.000	kr. 82.500	3,3	kr. 275.000
Etablering af 6 stk. monitoringsboringer inkl. fuldtidstilsyn	kr. 9.000	kr. 1.500	kr. 72.000	kr. 82.500	1,7	kr. 137.500
Etableing af 2 stk. boringer til bakterieinjektion	kr. 5.000		kr. 18.000	kr. 23.000		kr. 210.000
Indmåling med total station og pejling af boringer	kr. 9.000	kr. 1.000		kr. 10.000	3	kr. 30.000
Vandprøvetagning inden opstart af iltning (dag 0 eller -1)	kr. 9.000	kr. 6.500		kr. 15.500	3	kr. 46.500
Analyser af pesticider			kr. 19.525	kr. 19.525	3	kr. 58.575
Analyse for redoxparametre			kr. 16.500	kr. 16.500	3	kr. 49.500
Etableing af testfelter mm				kr. 249.525		kr. 807.075,00
Opstart af iltning og monitoring						
Opsætning af iltningsanlæg	kr. 4.500	kr. 775		kr. 5.275		
Iltelektroder, 2 stk.			kr. 45.500	kr. 45.500		
Diffusere				kr. 19.856		
flowmålere				kr. 15.126		
kobberør og fitting				kr. 8.161		
fittings				kr. 1.447		
reguleringsventler til iltflasker				kr. 6.498		
træplade til opsætning af flowmåler				kr. 132		
træplade til opsætning af flowmåler				kr. 64		
gasflasker ilt				kr. 2.639		
fittings				kr. 178		
kobberør				kr. 2.093		
rørskærer, vaterpas til borearbejde, gevindtape				kr. 710		
Opstart af iltning samt efterfølgende to dage til justering af ilt mv.	kr. 30.000			kr. 30.000		
Opstart				kr. 137.681	3	kr. 413.042
Drift						
Genopfyldning			kr. 4.000	kr. 4.000		
Tilførsel af bakterier, tilsyn	kr. 15.000			kr. 15.000		
½ x Iltmonitoring og vandprøvetagning (6 gange, dag 30, 45, 75, 120, 180, 270)	kr. 28.000	kr. 5.000		kr. 33.000		
½ x Analyser af pesticider			kr. 58.575	kr. 58.575		
½ x Analyse for redoxparametre , ca. hver anden prøvetagningsrunde			kr. 33.000	kr. 33.000		
Drift				kr. 143.575	3	kr. 430.725
Databehandling og rapportering				kr. 100.000	3	kr. 300.000
I alt				kr. 483.100	ex. rapportering	
				Opskalering	kr. 2.085.842	
				Dertil kommer monitorings og driftsorkostninger for en længere periode, afhængigt af Omkostninger er		
				Tilførsel af ilt	kr. 4.000	
				monitoring	kr. 30.500	
				Rapportering	kr. 25.000	
				I alt	kr. 59.500	

Pilotprojekt - In situ test af stimuleret aerob nedbrydning til oprensning af pesticidpunktkilder

Denne rapport omhandler et pilotforsøg i felten, hvor det er undersøgt, hvorvidt aerob nedbrydning af phenoxysyre-pesticider kan stimuleres ved tilsætning af ilt suppleret med tilsætning af specifikke pesticidnedbrydende bakterier. Forsøget er udført på en forurenede lokalitet, Skelstoftø, hvor der er konstateret en forurening med phenoxysyre-pesticider, som er vurderet til at kunne udgøre en grundvandsrisiko.



Miljøstyrelsen
Haraldsgade 51
2100 København Ø

www.mst.dk