



## **SGI Varia 499**

# **Biologiska metoder för *in situ* sanering av organiska markföroreningar**

**- EN KUNSKAPSSAMMANSTÄLLNING, "STATE OF THE ART"**

**Lennart Larsson  
Bo Lind**

Version 2, 2001-02-22

<b>FÖRORD</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUKTION</b> .....	<b>4</b>
<b>2. SANERINGSBEHOVET</b> .....	<b>5</b>
2.1. FÖRORENADE MARKOMRÅDEN I SVERIGE .....	5
2.2. UTVECKLING AV SANERINGSMETODER .....	6
<b>3. MARKSYSTEMET</b> .....	<b>8</b>
<b>4. SANERINGSMETODER IN SITU</b> .....	<b>9</b>
4.1. INJEKTIONS-, EXTRAKTIONS-, RECIRKULATIONSSYSTEM .....	10
4.2. LUFT-/BIOSPARGING .....	12
4.3. BIO-/VENTILERING .....	13
4.4. REAKTIV BARRIÄR .....	15
4.5. NATURLIG SJÄLVRENING .....	17
4.6. IN SITU JORD TVÄTT .....	19
4.7. PNEUMATISK OCH HYDRAULISK SPRÄCKNING .....	19
4.8. IN SITU UPPVÄRMNING (ÅNGINJEKTION OCH ELEKTRISK UPPVÄRMNING) .....	19
4.9. KEMISK IN SITU OXIDATION .....	20
4.10. HYDRAULISK INNESLUTNING .....	20
<b>5. RESULTAT FRÅN UTVALDA IN SITU METODER I PILOT- OCH FULLSKALA</b> .....	<b>22</b>
5.1. SANERING AV ALIFATER .....	22
5.2. SANERING AV MONOAROMATER OCH POLYAROMATER .....	26
5.3. SANERING AV KLORERADE ALIFATER .....	30
5.3.1. <i>Aeroba förhållanden</i> .....	30
5.3.2. <i>Anaeroba förhållanden</i> .....	34
5.3.3. <i>Anaerob-aerob kombination</i> .....	36
5.3.4. <i>Övriga metoder</i> .....	38
<b>6. BIOGEOKEMISKA PROCESSER FÖR NEDBRYTNING AV ORGANISKA MILJÖFÖRORENINGAR</b> .....	<b>40</b>
6.1. ELEKTRONACCEPTORER .....	40
6.2. ALIFATER (SPEC. ALKANER OCH ALKENER) .....	42
6.2.1. <i>Inledning</i> .....	42
6.2.2. <i>Kemisk struktur och egenskaper</i> .....	42
6.2.3. <i>Biologisk nedbrytning</i> .....	44
6.3. MONOAROMATER OCH PAH .....	50
6.3.1. <i>Inledning</i> .....	50
6.3.2. <i>Kemisk struktur och egenskaper</i> .....	50
6.3.3. <i>Biologisk nedbrytning</i> .....	51
6.3.4. <i>Biotillgänglighet</i> .....	57
6.4. KLORERADE ALIFATER .....	59
6.4.1. <i>Inledning</i> .....	59
6.4.2. <i>Kemisk struktur och egenskaper</i> .....	60
6.4.3. <i>Biologisk nedbrytning</i> .....	61
6.4.3.1. <i>Anaerob nedbrytning</i> .....	62
6.4.3.2. <i>Aerob nedbrytning</i> .....	70
6.4.3.3. <i>Anaerob-aerob nedbrytning</i> .....	76
<b>7. VAL AV STRATEGIER VID BIOSANERING</b> .....	<b>77</b>
7.1. VAL AV SANERINGSMETOD .....	77
7.2. INTEGRERADE BEHANDLINGSSÄTT OCH BEHANDLINGSTÅG .....	79
<b>8. REFERENSER</b> .....	<b>80</b>

## FÖRORD

Föreliggande rapport är resultatet av ett projekt inom SGI:s ramprogram Renare Mark. Ramprogrammets övergripande mål är att medverka till en bättre och effektivare markanvändning med minskade risker för emissioner och miljöskador. Rapporten avses bilda kunskapsbas både för praktiska saneringsprojekt och för kommande FoU-insatser. Projektet initierades av avd. chef Jan Sundberg, inledningsvis med fil dr Jörgen Ejlertsson som projektledare. Projektledarskapet övertogs senare av fil dr Ola Holby och därefter av Bo Lind som tillsammans med Lennart Larsson ansvarar för sammanställningen i denna rapport. Huvuddelen av texten har skrivits av Lennart Larsson. Delar av kapitel 3 samt kapitel 6.1 och inledande delar av 6.3.1- 6.3.4 bygger på Holbys arbete.

SGI avser att fortsätta bevaka utvecklingen inom området. Internetpubliceringen erbjuder möjlighet att enkelt ajourhålla och utveckla innehållet och vi tar gärna emot Era synpunkter på rapporten.

Göteborg i februari 2001

Bo Lind  
Projektledare

## 1. INTRODUKTION

Denna rapport behandlar *in situ* metoder för sanering av organiska föroreningar i mark, med fokus på i första hand biologiska metoder. Avsikten har varit att presentera metoder relevanta för svenska förhållanden, samt de erfarenheter som idag finns från pilot- och fullskaleanvändning av de olika metoderna. För att ge en bakgrund och ökad förståelse för möjligheterna att kombinera och utveckla olika biologiska saneringsmetoder ges också en tämligen ingående beskrivning av de biogeokemiska processer som styr nedbrytningen av de organiska föroreningarna.

I det moderna svenska samhället hanteras tusentals organiska ämnen med potential att uppträda som markföroreningar. Olika ämnen kräver skilda saneringsmetoder och det har inte varit möjligt inom ramen för detta projekt att presentera en täckande bild över hela detta fält. Av det stora antal organiska markföroreningar som förekommer i Sverige har vi valt att koncentrera oss på huvudgrupperna **alifatiska och aromatiska kolväten** samt **klorerade alifater**. Rapporten fokuserar på metoder och processer. I rapporten behandlas enbart biologiska saneringsmetoder som dock kan kombineras med andra platsbundna metoder i form av invallning, impermeabla väggar, stabilisering etc.

Rapporten kan ses som en form av ”State of the Art”-rapport, som presenterar den kunskap som idag föreligger kring biologiska metoder relevanta för *in situ* sanering av organiskt förorenade markområden i Sverige.

## 2. SANERINGSBEHOVET

### 2.1. Förorenade markområden i Sverige

Synen på behovet av sanering av förorenade markområden i Sverige har förändrats efterhand som kunskapsunderlaget förbättrats. 1995 publicerade Naturvårdsverket en översiktlig kartläggning av efterbehandlingsbehovet beträffande förorenade markområden i Sverige (*SNV Rapport 4393, 1995*). I den framkom att ca 1700 objekt identifierats fram till 1995, varav ca 1450 bedömdes vara i behov av vidare undersökningar eller åtgärder. Av dessa 1450 objekt var drygt 500 sådana där förorening konstaterats genom fältundersökningar och var förorenade antingen av tungmetaller eller organiska föroreningar eller bådadera. Man ansåg att man fram till 1995 sannolikt identifierat merparten av de största och allvarligaste efterbehandlingsobjekten i Sverige. I kartläggning erhöll branscher med många små anläggningar medvetet låg täckningsgrad. Man uppskattade grovt att det totala efterbehandlingsbehovet i landet, inklusive mindre områden, var ca 7000 objekt. Den tid som uppskattades krävas för åtgärder angavs till ca 30 år och totala saneringskostnaden till ca 20 mdr kr (i 1995 års prisnivå) (*SNV, 1995*).

Objekten delades in i fyra olika riskklasser, där en bedömning gjordes främst utifrån hur allvarliga effekter som en viss föroreningsspridning och exponering kunde ge upphov till samt från sannolikheten att en sådan spridning och exponering skulle uppkomma.

Riskklass 1: Mycket stor risk

Riskklass 2: Måttlig/stor risk

Riskklass 3: Liten risk

Riskklass 4: Mycket liten risk

Resultaten från SNV-inventering 1995 har sammanställts i Tabell 1.

Tabell 1. Förorenade markområden i Sverige enligt 1995 års bedömningar, fördelade i riskklasser ( *SNV Rapport 4393, 1995*).

Förorening Bransch\Riskklass	Petroleumföroreningar			Klorerade kolväten <sup>1/</sup>			PAH-föroreningar		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SNV, 1995. Totalt, ca	30	120	60	35	105	25	25	65	15

1/ Innefattar främst klorerade alifater (lösningsmedel), klorfenoler (främst PCP), PCB och dioxiner.

Enligt nämnda SNV-inventering ansågs att när verksamheter som exempelvis bensinstationer, bilverkstäder, ytbehandlingsindustrin, träimpregneringsanläggningar och kemiindustribranscherna kartlagts mer heltäckande skulle bilden sannolikt komma att ändras. Antalet områden, framförallt av de som identifierats som petroleumförorenade liksom antalet områden förorenade med klorerade kolväten och PAH, skulle komma att öka. Detta har på senare tid i hög grad bekräftats.

Enligt *Fakta SNV (2000)* pågår nu fortsatta inventeringar av potentiellt förorenade områden i Sverige. Inventeringarna fortgår för närvarande i samtliga län utom i Halland. Antalet områden som är i behov av sanering uppskattas idag till ca 22 000, och av dessa har 12 000 identifierats. De allvarligaste branscherna anges vara bl a gruvor, järn och stål, metallverk och ferrolegeringsverk, kloralkaliindustrin, gasverk, garverier, sågverk med doppning. De allvarligaste föroreningarna är kvicksilver, kadmium, arsenik, bly, stabila organiska ämnen, klorerade lösningsmedel, stabila bekämpningsmedel, kreosot samt olika petroleumprodukter. Den totala framtida kostna-

den för efterbehandling i Sverige uppskattas idag till ca 25 mdr kr. Hur stor andel av de hittills identifierade objekten som klassats i riskklass 1 och hur de olika föroreningslagen fördelas på dessa objekt har inte gått att få information om. Det kan konstateras att antalet identifierade objekt förorenade med bl a klorerade kolväten och PAH har ökat markant, jämfört med antalet identifierade objekt 1995. Det kan nämnas att i Danmark var 1995 ca 10 000 objekt i behov av efterbehandling identifierade och att det varje år tillkom ca 200 nya objekt (*SNV Rapport 4393; 1995*).

Svenska Petroleum Institutet genomför för närvarande, genom sin miljösaneringsfond SPIMFAB, ett omfattande undersöknings- och åtgärdsprogram för sanering av gamla bensinstationer i Sverige. Enligt nyligen erhållen information från Svenska Petroleuminstitutet (muntlig information, 2000, via Elke Myrhede, SGI) har idag totalt ca 8000 anmälningar om nedlagda bensinstationer erhållits. Ett antal av dessa har dock befunnits vara dubbel- eller trippelanmälda och man bedömer att totalt ca 5000 – 6000 stationer är i behov av undersökning. Omkring 400-500 stationer har hittills undersökts och vid ca hälften av dessa pågår, eller har genomförts, saneringsarbeten. Av de stationer som identifierats uppskattas ca 2500 – 3000 komma att behöva saneras. Därtill finns saneringsbehov av ett okänt antal spill från andra typer av drivmedelsdepåer runt om i Sverige, som inte ingår i SPIMFABs åtaganden. Förutom SPIMFABs uppgifter kring nedlagda bensinstationer finns ingen samlad bild av det totala antalet områden med organiska markföroreningar (Per Gullbring, Naturvårdsverket, 2000-11-10). I Tabell 2 redovisas dagens bedömningar beträffande behovet av marksaneringar i Sverige.

Av ovanstående framgår att saneringsbehovet i Sverige är stort. De flesta saneringsmetoder som skulle kunna användas för åtgärder har utvecklats och kommersialiserats i USA, Tyskland och Holland, medan erfarenheten av metoderna är betydligt mindre i Sverige. Härav saknas i många fall idag underlag för ett rationellt val mellan olika saneringstekniker för skilda situationer. Vissa av metoderna används rutinmässigt, är kommersiellt lättillgängliga och fungerar utmärkt i många situationer, medan andra endast fungerar i mycket speciella fall eller är oprövade i större skala.

*Tabell 2. Uppskattade och, fram till jan. 2000, identifierade områden/platser i Sverige med markföroreningar (NV, Per Gullbring 2000-11-10; SPIMFAB, hemsida 2000-11-09).*

Områden/platser i behov av sanering	Naturvårdsverket; alla typer av markföroreningar	SPIMFAB; bensin och oljeföroreningar
Uppskattade, ca	22000	6000
Hittills identifierade eller prioriterade för vidare undersökning, ca	12000	800

## **2.2. Utveckling av saneringsmetoder**

Sedan länge har ett generellt behov av ökad kompetens och medvetenhet kring markföroreningsfrågor identifierats hos såväl verksamhetsansvariga som berörda myndigheter (SNV rapport 4318). I Sverige föreligger stort behov av etablering av både befintlig och ny saneringsteknik samt av ökad kunskap om när olika saneringsteknologier är bäst lämpade att användas för de platsspecifika föroreningsproblemen och hur dessa metoder kan utvecklas. Inte minst gäller detta för att områden med organiska markföroreningar skall kunna saneras på ett miljömässigt och ekonomiskt acceptabelt sätt. Därtill är det viktigt att öka kunskapen inom bl a miljömässig riskbedömning så att initiala ekonomiska resurser främst allokeras till de områden som är i störst

behov av sanering. Detta innefattar främst undersökning av vilka konsekvenser en markförorening medför, vilket i sin tur är beroende av platsspecifika förhållanden som närhet till yt- och grundvatten, bostäder, jordart, markanvändning m m. Markföroreningen kan vara ett akut hot mot omgivande miljö eller endast ett betydelselöst tillskott av kolväten, med potential att försvinna på naturlig väg.

I syfte att utveckla och etablera ny teknik inom saneringsområdet gick Naturvårdsverket och Miljöteknikdelegationen under våren 1998 ut med en inbjudan till markägare, konsulter och behandlingsföretag att med visst bidrag genomföra ett antal teknikdemonstrationer för efterbehandling av mark och grundvatten förorenade med klorerade lösningsmedel (*Miljöteknikdelegationen, 2000; Fakta SNV, 2000*). De förslag som valdes ut för demonstration i pilotskala var (information inhämtad våren 2000):

1. Biologisk behandling av grundvatten förorenat med klorerade lösningsmedel (bl a trikloretylen och 1,1,1-triklorethan) vid en garveritomt (fd läderfabrik) i Kävlinge. Anaerob och aerob nedbrytning angavs att testas av en pilotgrupp bestående av Marksanering Sverige AB, VBB VIAK samt Kävlinge kommun. En pilotreaktor angavs bli uppställd på det förorenade området med 3 steg, ett anaerobt och två aeroba.

2. Air sparging och vakuumenträktion angavs att testas av Rettig värme AB, Eko Tec AB och Johan Helldén AB. Metoden går ut på luftinjektion i den mättade zonen (air sparging) samt vakuumenträktion i den omättade. Objektet är en verkstadstomt i Fellingsbro med utsläpp av trikloretylen från ett tvättbad.

3. Reaktiv barriär för förhindrande av fortsatt spridning av klorerade lösningsmedel med grundvattnet vid en kemtvätt i Linköping angavs att demonstreras av en pilotgrupp bestående av VBB VIAK, Hercules Grundläggning AB, Höganäs AB, Inst. för geologi och geokemi vid Stockholms universitet samt Linköpings kommun. Barriären består av en genomsläpplig reaktiv vägg som installeras i flödet av det förorenade grundvattnet. Principen går ut på att metalliskt järn skall "katalysera" nedbrytningen av det klorerade lösningsmedlet.

Förberedelserna startades och merparten av demonstrationerna planerades att utföras under 1999. Resultaten av demonstrationerna planerades att utvärderas av en fristående konsult och publiceras i en rapport. Enligt muntlig information från Miljöteknikdelegationen febr. 2000, var projektet med Air sparging färdigt och resultaten på gång att utvärderas. Den biologiska behandlingen i Kävlinge pågick för fullt och beräknades vara klar under våren 2000. Den reaktiva barriären var försenad och ansågs inte komma i marken förrän under samma vår. Sanneringen planeras att följas under ca ett års tid. Detta innebär att slutrapport beräknas vara färdig 2001.

Ytterligare aktiviteter för teknikutveckling för sanering av förorenad jord och sediment har bedrivits under 1998-1999 i Stockholm. Åtta olika företagsgrupper har, i form av forsknings- och utvecklingsprojekt, demonstrerat var sin metod varav en metod, geooxidation, var av typen *in situ*. Förutom svenska företag har företag från Danmark, Holland, Finland och USA deltagit. Försöken har utförts på en industritomt i kv Lyftkranen i Ulvsunda, förorenad med PAH, olja och metaller. Processerna har avsett behandling av en eller flera av de tre matriserna; fyllningssjord, torrskorpelera och sjösediment – med inriktning på någon eller några av de tre föroreningsstyper som fanns i massorna. Resultatet visar att de termiska metoderna fungerat bäst för PAH och olja medan jordtvätten var effektivast för metaller. Försökstiden var dock begränsad till mindre än ett år och ingen av metoderna involverade biologiska metoder *in situ*. Detta är den första direkta jämförelsen som gjorts i Sverige, men de metoder som fungerat bra här behöver inte nödvändigtvis vara de bästa på alla ställen med liknande föroreningar.

### 3. MARKSYSTEMET

Marken speglar sin omgivning och egenskaperna är en produkt av både geologisk miljö, klimat och mänsklig påverkan. Marken är ett inhomogent system och det finns härav en uppsjö med olika möjligheter. En förorening kommer inte att utvecklas på samma sätt på två olika platser. Därför är det viktigt att ha god kännedom om förutsättningarna vid en förorenad plats innan man börjar en sanering. En organisk förorening kan mycket väl adsorberas av en organogen jord medan den rinner rakt igenom en minerogen. Även biomassan är ojämnt fördelad med "oaser" av biologisk aktivitet i ett annars ganska "sterilt landskap". Det kan vara så att föroreningen är akut toxisk för biomassan och kan därmed slå ut stora delar av den mikrobiologiska faunan på lokalen. På platser där det från början finns liten biologisk aktivitet eller att aktiviteten har slagits ut, är det i princip omöjligt att genomföra en naturlig självrening, utan stimulans eller tillsats av nya mikroorganismer. Rådande geologi och hydrologi inom området är av stor betydelse för möjligheten till olika saneringsmetoder och har även ett stort inflytande över hur föroreningen fördelar sig och rör sig i marken.

Marksystemet i naturliga svenska jordar kan väsentligen delas upp i två skilda delar av betydelse i föroreningssammanhang; den övre markprofilen, eller jordmånen, som omvandlats av atmosfären och levande organismer samt den undre mera ursprungliga jordarten. Jordmånen, som ofta upptar omkring 1 m av jordprofilen, utgör ett komplext dynamiskt system där död biologisk vävnad bryts ner, mineraliseras och görs tillgängligt som näring tillsammans med minerogena vitteringsprodukter. Här sker det livsviktiga utbytet mellan levande och död materia genom ett komplicerat ekosystem med ett stort antal kemiska, fysikaliska och biologiska processer.

I den undre mera ursprungliga och opåverkade delen av jorden (C-horisonten) är den biologiska aktiviteten mycket lägre och här har jordartens kornstorleksammansättning (textur) samt lagringsförhållanden (struktur) avgörande betydelse för spridning och omsättning av olika föroreningar.

Till marksystemets viktigaste komponenter hör också vattnet. I den undre delen av jordprofilen där alla porer är helt vattenfyllda finns det rörliga grundvattnet. Ovanför denna mättade zon finns den omättade zonen där markporerna är mer eller mindre tomma på vatten och istället fyllda med markgas. I den omättade zonen rör sig infiltrerat vattnet nedåt som sjunkvatten i marken.

I allmänhet är petroleumkolväten möjliga att bryta ner på biologisk väg. I de flesta fall kan syre ( $O_2$ ) utnyttjas som elektronacceptor (dvs det ämne som slutligt tar hand om elektronerna vid nedbrytning av organiska ämnen). Den biologiska nedbrytningen av kolväten kan kort beskrivas enligt formeln:

$$\text{Kolväte} + \text{elektronacceptor} + \text{mikroorganismer} + \text{närsalt}$$
$$\Rightarrow \text{Koldioxid} + \text{vatten} + \text{mikroorganismer} + \text{avfallsprodukt}$$

Även andra elektronacceptorer än syre (framför allt nitrat) kan användas och har använts till en del förorenande ämnen som t ex aromater (Norris 1994). Hastigheten med vilken nedbrytningen kommer att ske och mängden kolväte som bryts ner beror på ett flertal faktorer, främst; a) kvalitén och kvantitet av elektronacceptorer, b) mängd och kvalitet av närsalter, c) typ av mikroorganismer och deras kapacitet, d) mängd, sammansättning och typ av kolväte samt e) omgivande faktorer som geologi, hydrologi etc.



#### 4. SANERINGSMETODER *IN SITU*

I litteraturen finns sammantaget ett 40-tal saneringsmetoder för mark och grundvatten beskrivna, många utformade för *in situ* behandling. Användningen och de praktiska erfarenheterna av de olika metoderna är dock mycket varierande. Sanering *in situ* innebär att sanering sker direkt nere i jorden och/eller grundvattnet och kan ske även om marken är bebyggd, eller då annan aktivitet pågår ovan jord. Med *ex situ* behandling menas att förorenad jord grävs upp och behandlas antingen inom samma område, på plats ("on site"), eller också kan materialet transporteras iväg till annan plats för behandling ("off site") (Lindmark och Larsson, 1995). I vissa fall kan uppumpning och rening av grundvatten ovan jord ingå som en komplettering till *in situ* sanering. I denna rapport har vi valt att behandla de saneringsmetoder som vi ansett som mest intressanta för svenska förhållanden. Avsnitt 4.1; 4.2; 4.4; 4.5 och 4.10 innefattar *in situ* metoder som framför allt används i grundvattenzonen. Avsnitt 4.3 behandlar *in situ* metoder för förorenad omätnad zon och avsnitt 4.6 – 4.9 metoder som kan användas i båda fallen. En del av metoderna i avsnitt 4.1-4.4 kan kombineras med metoder för motsatt zon.

Saneringsmetoderna kan generellt delas in i:

- \* Koncentrationsmetoder
- \* Immobiliseringsmetoder
- \* Destruktionsmetoder

Koncentrationsmetoder (eller separationsmetoder) syftar till att samla in och koncentrera föroreningar från en stor volym till en liten volym, eller att föra över föroreningar från ett media till ett annat (t ex från vatten till luft eller jord till luft) för senare omhändertagande. Omhändertagandet kan innebära att föroreningen destrueras eller immobiliseras. Exempel på en koncentrationsmetod är att pumpa upp förorenat grundvatten och rena det i ett kolfilter. Om kolfiltret sedan förbränns destrueras föroreningarna, medan det immobiliseras om det deponeras. Exempel på koncentrationsmetoder är markventilering, grundvattenventilering, tvättmetoder, termisk avdrivning, bortgrävning samt pumpa och rena (Lindmark och Larsson, 1995).

Immobiliseringsmetoder innebär att föroreningen immobiliseras och därmed förhindras att spridas och nå omgivande miljö. Inte heller här minskar dock mängden av den farliga substansen. Exempel på immobilisering *ex situ* är t ex att gjuta in föroreningen i betong och *in situ* att omge föroreningen med vertikala- eller horisontella barriärer eller att styra grundvattennivåerna så att inte förorenat vattnet avrinner från området (Lindmark och Larsson, 1995).

Destruktionsmetoderna är de enda som bryter sönder föroreningen och därmed minskar riskerna för all framtid. Syftet med destruktionsmetoderna är att producera harmlösa restprodukter som koldioxid, vatten och salter. I vissa fall kan dock toxiska och mobila ämnen bildas i samband med destruktionsmetoderna räknas förbränning samt biologisk- och kemisk nedbrytning (Lindmark och Larsson, 1995).

Föreliggande rapport behandlar sanering av organiska föroreningar *in situ*. De *in situ* metoder som används för detta ändamål är till stor del baserade på biologisk nedbrytning. Hur många förorenade objekt som under 1990-talet behandlats med biologiska metoder i Sverige har inte gått att klarlägga. Man kan dock konstatera att det främst har varit metoden "uppgrävning och deponering" som varit förhärskande och att biologiska metoder inte har använts och utvecklats i samma takt i Sverige som t ex i USA och Danmark. Enligt SNV (1995) behandlades i Danmark varje år 80 % av all förorenad jord med biologiska metoder.

*In situ* metoder för rening av organiska föroreningar bör framförallt övervägas när en eller flera av nedanstående kriterier är uppfyllda;

- föroreningen ligger i jord och/eller i grundvattnet under befintliga byggnader, parkeringsplatser, vägar, järnvägar etc
- föroreningen ligger på relativt stort djup under markytan (gäller både jord och grundvatten)
- utrymmet för att utföra ex situ behandling inom området är begränsat i kombination med att behandling utanför området inte accepteras (t ex på grund av miljömyndigheternas krav)
- tidsaspekten är underordnad
- kostnadsbilden är fördelaktig

Som tillägg till dessa kriterier måste också ställas de förutsättningar som krävs för respektive behandlingsmetod, bl a möjligheterna att installera olika typer av utrustning, att andra ingrepp i området begränsas, etc.

Fördelar med *in situ* behandling är att arbetskraft och omgivning inte exponeras för föroreningar på samma sätt som vid ex situ teknik, att miljöstörande vägtransporter av förorenad jord undviks, att föroreningarna inte flyttas till annat område samt att kostnaderna för uppgrävning och transport kan undvaras.

Nackdelarna med *in situ* behandling är bl a att det krävs stora insatser av fältundersökningar för att karakterisera marken. Det krävs ett kvalificerat kontrollprogram för att optimera processen och övervaka så att inga föroreningar sprids utanför saneringszonen. Saneringen tar ofta längre tid att utföra än ex situ behandling och tekniken är mer känslig för lokala betingelser som t.ex. kornstorlek, kompaktering etc.

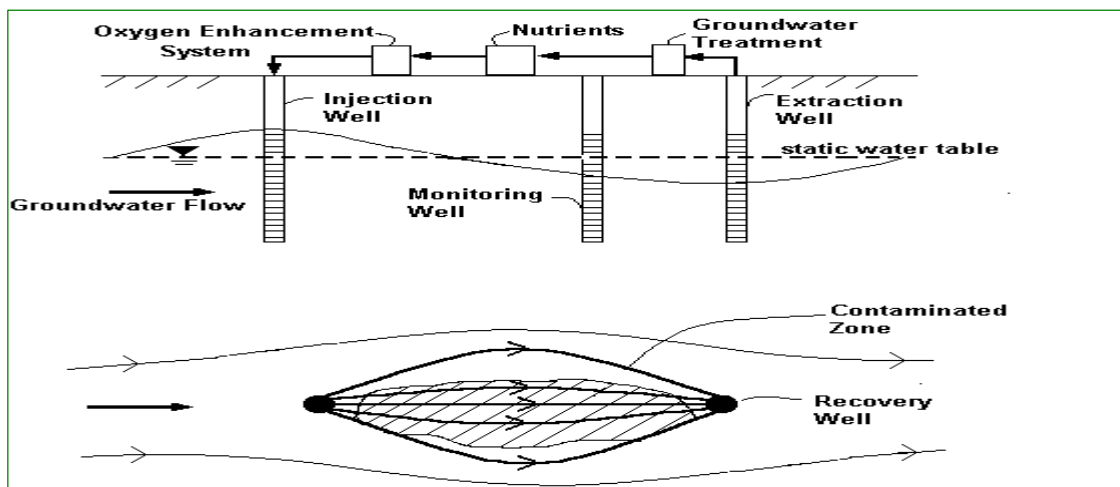
#### **4.1. Injektions-, extraktions-, recirkulationssystem**

Flera olika metoder för injektion och pumpning, både i mättad och omättad zon, har utvecklats. I följande kapitel presenteras tre huvudtyper:

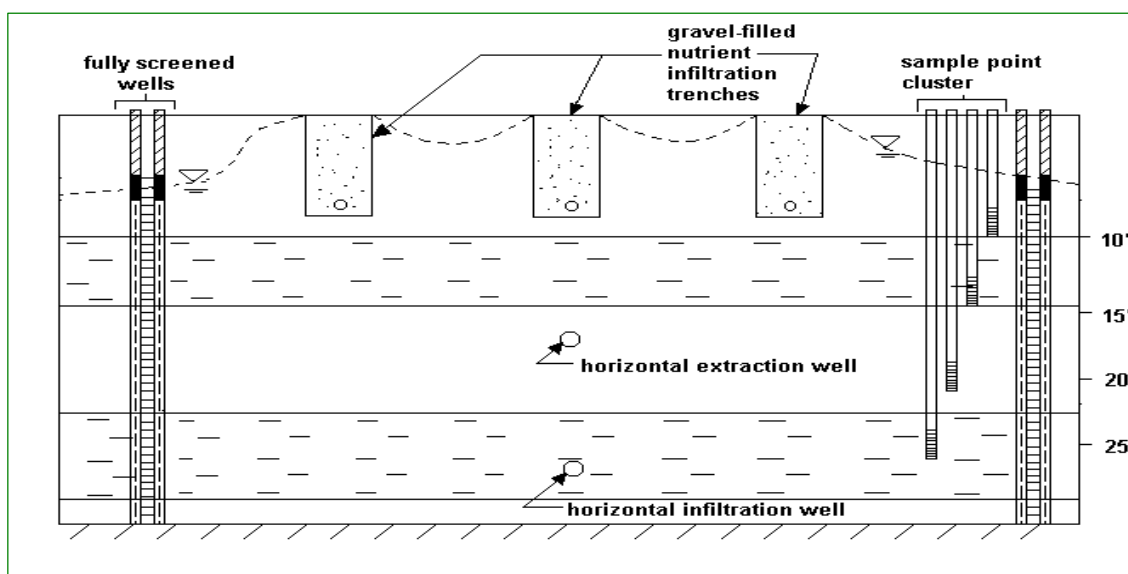
- 4.1, Injektions – och extraktionssystem med grundvattenbrunnar
- 4.2, Luft-/biosparging; Luftning under grundvattenytan
- 4.3, Bio-/ventillering; Luftning av omättad zon

Injektions och extraktionssystem med brunnar, Figur 4.1, är en metod för behandling av förorenat grundvatten direkt *in situ*. Injektion av nödvändiga nedbrytningsstimulerande ämnen sker uppströms och extraktion nedströms. I de fall tillräcklig rening inte åstadkoms på detta sätt renas vattnet även ovan jord i t ex bioreaktor, varefter det återförs till injektionsrören. Designen kallas då för recirkulationscell. Metoden används för sanering av de flesta organiska föroreningar som petroleumprodukter, klorerade alifater, klorerade fenoler etc.

Alternativa utförande finns som t ex multipla injektionspunkter, infiltrationsgropar i stället för brunnar (för mer ytligt liggande grundvatten) och horisontella injektions- och extraktionsrör. Metoden kan även kombineras med biosparging, se avsnitt 4.2 nedan. Ett system med infiltrationsgropar, som främst är lämpat för anaeroba behandlingar, beskrivs schematiskt i Figur 4.2. I dessa gropar tillsätts nedbrytningsstimulerande ämnen som tillåts infiltrera ned i det förorenade grundvattnet.



Figur 4.1. Injektion och extraktion. (Från Grindstaff, 1998).



Figur 4.2. Schematisk beskrivning av system med infiltrationsgropar. (Från Grindstaff, 1998).

Grundvattnet kan även få att cirkulera direkt *in situ*, dvs utan uppumpning till markytan (EPA, 2000a). Metoderna går i allmänhet ut på att direkt *in situ* överföra flyktiga föreningar i grundvattnet till gasfas, varefter själva gasfasen tas om hand och renas ovan jord. Metoderna benämns "In-well vapor stripping", "In-well air stripping", "In situ vapor stripping", "In situ air stripping" och "Vacuum vapor extraction".

Oavsett vilken metod som används för rening av grundvatten är provtagningsrör i de allra flesta fall installerade i och nedströms extraktionsrören, med avsikt att kontrollera spridning och saneringseffektiviteten.

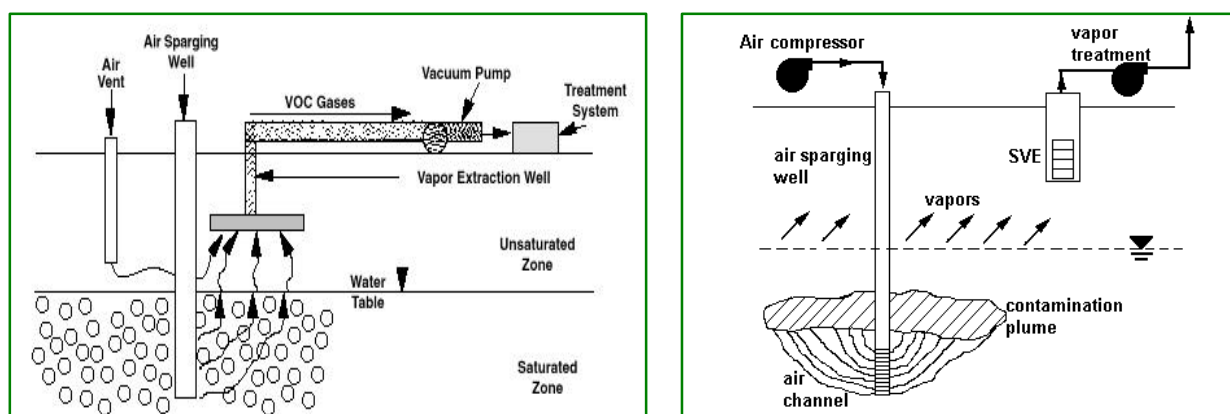
Vid *in situ* sanering med tillförsel av syre är det ur saneringssynpunkt mer effektivt om rent syre kan tillföras istället för luft. Högre effektivitet i att få syremättat grundvatten och därtill högre syrehalt i omättad zon kan härav erhållas. Nackdelen är att det är betydligt dyrare att tillföra syre jämfört med luft. Användandet av ett relativt enkelt system (delvis patenterat) innefattande syntetiska zeoliter som adsorbent av kvävgas ur luft, resulterande i 90-95 % syrehaltig luft ges i *Zamojski m. fl., (1999)*.

#### 4.2. Luft-/biosparging

Med luft- eller biosparging, Figur 4.3, trycks syre ned under grundvattenytan. Härigenom frigörs och transporteras en del lättflyktiga kolväten upp i omättad zon och kan vid behov omhändertas genom gasextraktion. Andra kolväten bryts ned i grundvattnet och i den omättade zonen genom tillsatsen av syre. Luftsparging innebär att lufttrycket/luftflödet är så stort att det främst är förångning av föroreningarna upp i omättad zon och eventuellt även upp till marknivå som är den primära saneringsmetoden. Lägre luftflöden väljs när det främst är biologisk nedbrytning som avses. Metoden anses vara mest lämpad i homogena jordar (för att motverka okontrollerad gastransport), då föroreningen föreligger i den mättade zonen och i material med hydraulisk konduktivitet  $< 10^{-5}$  m/s. Dock får konduktiviteten inte vara alltför låg. I detta avseende är influensradien (ROI) av största betydelse att fastställa för bästa design. ROI är den största radien som luften kan transporteras och generera överföring av förorening i gasfas och/eller upprätthålla tillräcklig syrehalt i vattnet för tillfredsställande bionedbrytning. Jordgas-extraktion (SVE, se bio-/ventilering nedan) är ofta kopplad till sparging för att öka kontrollen av gasspridningen, speciellt om hög tillförsel av luft utförs och/eller då grundvattnet har högt innehåll av flyktiga föroreningar. Exempel på bestämning av ROI vid biosparging och underlag för beslut avseende kontinuerlig visavi periodvis luft/syre tillförsel kan erhållas i *Mulder m fl. (1999)* respektive i *van Ree m. fl. (1999)*.

Metoden används för att sanera både klorerade och icke-klorerade kolväten i både mättad och omättad zon. Eftersom klorerade kolväten i allmänhet är tyngre än vatten, i motsats till vanliga petroleumkolväten, föreligger de förra ofta djupare i gv-zonen. Metoden är användbar för flyktiga och/eller lösta föroreningar och/eller aerobt nedbrytbara föroreningar, främst i grundvattnet men även i kapillärzonen just över grundvattenytan. Metoden är inte lämpad att användas då fri produkt föreligger (kan orsaka att fri produkt sprider sig). Den är heller inte lämpad att användas då källare, avloppstrummor eller andra underjordiska hålrum finns i närheten, under förutsättning att gasextraktionssystem inte är installerade. Därtill är metoden inte lämpad i grundvattensystem som har impermeabla skikt. Detta eftersom förorenad luft i sådant fall inte fritt kan strömma upp i ovanliggande zoner, vilket bl a kan ge stor osäkerhet vart gasföroreningarna tar vägen eller orsaka okontrollerade mindre tryckexplosioner *in situ*. Täta skikt kan också motverka spridningen av syre och hämma den biologiska nedbrytningen.

Vid biosparging kan, utöver eller istället för syre eller luft, t ex metan (naturgas) tillsättas för att påskynda bionedbrytningen. Val av tillsatsämnen styrs bl a av om aerob eller anaerob nedbrytning önskas.



Figur 4.3. Exempel på beskrivningar av olika typer av jordgasextraktion (SVE) (vänstra bilden från US EPA 2000i; högra bilden från Grindstaff, 1998).

Både sparging och injektion/extraktion kan designas som recirkulerande behandlings-celler/zoner, som biobarriärer eller kombinationer härav. I de fall designen/kombinationen syftar till att erhålla en biobarriär (se även avsnitt 4.4. ”Reaktiv barriär”, nedan) installeras brunnar så att för saneringsprocessen nödvändiga ämnen kan tillföras mikroorganismerna. Syftet är här att dessa etablerar sig i tillräcklig grad i en zon eller delzoner (då med olika redoxförhållanden) nedströms. När föroreningen har transporterats genom sådan/-a zon/-er är målsättningen att föroreningen fullständigt mineraliserats. Recirkulationscell är en hydrauliskt kontrollerad zon i vilken grundvattnet recirkuleras tills saneringsmålen är uppnådda. Designen av en recirkulationscell kan i vissa fall syfta till att endast delar, framför allt närmast det mest förorenade området, av föroreningsplymen är hydrauliskt kontrollerad. I övriga delar tillåts föroreningen transporteras nedströms, samtidigt som kontroller utförs att nedbrytningen fortsätter tillfredsställande grad även i dessa delar.

Metoden med Luft-/biosparging (jordgasextraktion) används främst för flyktiga och/eller vattenlösliga organiska föroreningar, men med olika kombinationer av metoderna kan även andra organiska föroreningar behandlas. Kombinationen recirkulationscell inkluderande sparging är vanlig vid sanering av bl a klorerade kolväten.

En amerikansk manual för utförandet av *in situ* luftsparging kan erhållas gratis på US Army Corps hemsida (US Army Corps, 1997) och till den ytterligare information i Becker och Baker (1998).

### 4.3. Bio-/ventilering

Ventilering går i princip ut på att med högt luftflöde i speciellt perforerade rör, applicerade i omättad zon, ventilerar bort flyktiga organiska föroreningar, delvis beskrivet i Figur 4.4. Ventilering kan i vissa fall orsaka att flyktiga föroreningar forceras in i områden, t ex i källarområden, där andra problem kan uppstå. Ventilering har bl a härav utvecklats/förändrats från att enbart blåsa ned luft *in situ* till att alternativt bara suga upp luft (evakuera) eller en kombination av båda. Ändringen har i allmänhet givit bättre kontroll på diffusa transporter av gasformiga föroreningar *in situ*. Ventilering i form av extraktion kallas i allmänhet jordgas-extraktion (SVE, ”Soil Vapor Extraction”), varvid omättad förorenad zon sätts under vakuum. Uppsugen förorenad luft

renas med katalysator, kolfilter etc (Benning och Sabalowsky, 1996). SVE är mindre lämpad i jordar med hög heterogenitet, hög fukthalt och hög andel finkornigt material. Metoden kan kopplas till termisk *in situ* behandling. Genom att den tillförda luften uppvärms före injektion ("thermal enhanced SVE") kan betydligt högre reduktionsgrader erhållas.

Bioventilering är en relativt ny saneringsteknik som utvecklats från vanlig ventilering. Principen ingår i Figur 4.4. Metoden använder sig av betydligt lägre luftflöden med målsättningen att minimera förångning och maximera mikrobiell nedbrytning av föroreningen i jorden. I det här fallet är det framför allt syretillförsel som är primärt. Vid behov kan även nedbrytningsstimulerande näringsämnen tillsättas, uppvärmning ske av tillförd luft och/eller gasextraktionsrör kopplas till den omättade zonen. Nedbrytningen sker under tiden som både syret och gasfasföroreningarna sakta transporteras genom den bioaktiva jorden. Genom minskat luftflöde minskas även ovanstående potentiella gasackumuleringsproblem. Även adsorberade föroreningar kan brytas ned när syre tillförs porgasen. I båda fallen är det viktigt att upprätthålla tillräcklig fuktighet, så att jorden inte torkar ur med minskad biologisk nedbrytningsaktivitet som följd. Bioventilering kan ta månader till flera år att utföra.

Alla aerobt nedbrytbara organiska föroreningar kan i princip behandlas med bioventilering, speciellt medeltunga petroleumprodukter (t ex diesel, jet bränsle). Eftersom lättare produkter som bensin tenderar att lätt förångas brukar vanlig ventilering istället appliceras på sådana föroreningar. Generellt tar tyngre produkter som t ex smörjoljor längre tid att bryta ned jämfört med lättare produkter. De viktigaste faktorerna för bioventilering är markens permeabilitet, jordstruktur (mikro-/makroporer), stratifiering och den platsspecifika bionedbrytbarheten av föroreningen. Bioventilering är mindre lämpat för områden med en grundvattennivå mindre 1 meter under markytan. I de fall metoden inkluderar vakuumenträkning måste metoden utföras med viss försiktighet när grundvattennivån ligger ytligare än 3 meter. Detta beror på att grundvattennivån kan höjas lokalt p g a vakuumsättningen, varvid vatten kan komma in i extraktionsrören och därmed starkt reducera gasgenomströmningen.

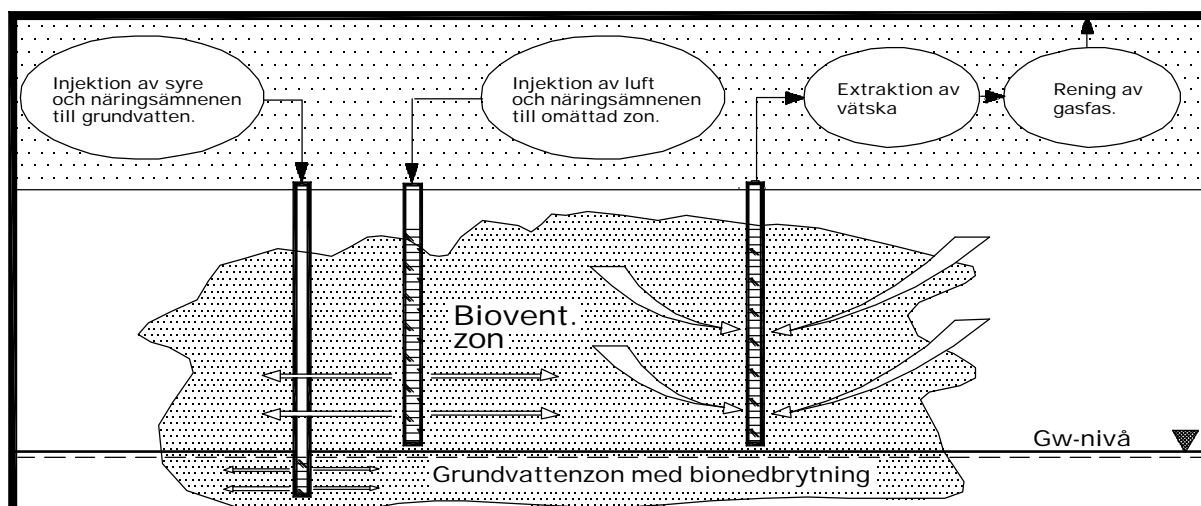
I USA krävs i vissa fall att en inledande pilotstudie utförs som visar att saneringsmålet kan nås med bioventilering. Detta gäller om saneringsmålet är en slutkoncentration av förorening  $< 0,1$  ppm i jorden och/eller om målet är mer än en 95%-ig reduktion av totala petroleumkolväten (US EPA, 2000b; US EPA, 2000h).

Erfarenheter vid fullskalesaneringar har visat att man ibland fått upprepa ventileringen (gäller främst ventilering men i viss mån även bioventilering) för att få tillfredsställande sanering. Om provtagning tas av gasfasen efter att konstant ventilering av ett område utförts under en begränsad tid kan resultatet indikera att gasfasen är ren. En eventuell efterföljande kontroll något halvår senare kan emellertid visa att halterna i gasfasen ökat. Detta p g a av att det ibland kan ta betydande tid innan jämvikt inställt sig mellan fast fas och porgas/bulkfas. Detta är i sig kopplat till jordstrukturen (bl a organiskt innehåll och omfattningen av mikroporer i matrisen) och stratifieringen. Det är alltså viktigt att ventilering/bioventilering tillåts genomföras under tillräckligt lång tid.

Bioventilering har under senare tid fått ökad användning, både i Sverige och utomlands. Exakt hur många områden i Sverige som har behandlats och är under behandling med denna typ av metod har inte gått att klarlägga, men uppskattas till ett 40-tal.

En ny och modifierad form av bioventilering kallas på engelska "Bioslurping", där ordinär bioventilering kopplas till uppsugning av fri produkt från främst grundvattentytan (och vid behov

kapillärzonen) genom vakuumsättning. Den fria produkten destrueras eller återvinns. Eftersom föroreningen ofta även till betydande delar föreligger i omättad zon inkluderas ofta Bioventing i Bioslurping. Manual för utförande av sådan kombination finns gratis att tillgå på internet (*US Army Corps, 1999*). Därtill kan ytterligare exempel på sådan kombination erhållas i *Eloskof m. fl. (1999)*; *Houck m. fl. (1999)*, *Woodward m. fl. (1999)* och i *Baker m. fl. (1999)*.



Figur 4.4. Beskriver primärt Bioventilering. Här kopplat till uppsugning av gasfas (SVE) som kondenseras (delvis) ovan jord till vätska och rening av resterande gas. Beskrivet utförande är även kopplat till syresättning av grundvattnet (luft-/biosparging).

Amerikansk manual för bioventilering finns gratis att tillgå på The Air Force Center for Environmental Excellence internetsida (*AFCEE, 2000*), och även från Amerikanska Naturvårdsverket (*US EPA, 1995a*; *US EPA, 1995b*). I fallet bioventilering finns även modelleringsprogram för initial screening och utvärdering av möjligheterna att applicera metoden på varje specifikt förorenat område. Modellen, som främst är avsedd för kolväteförorenade områden kallas BioSVE i vilken Bioventilering kan kopplas med SVE och Slurping (*Slope-analysis, 2000*). Vidare, *Fields m. fl. (1999)* ger förenklat exempel på design av kombinerat luft sparging och SVE. En amerikansk manual för utförandet av SVE och Bioventilering kan erhållas gratis på internet (*US Army Corps, 1995*). Ytterligare amerikanska dokument avseende andra typer av saneringsutföranden och därtill dokument om hälso- och säkerhetsaspekter vid sanering med bl a air sparging, bioventing etc, kan fås gratis genom sökning på respektive ord på följande adresser: <http://www.usace.army.mil/search.html#Publications> och <http://www.usace.army.mil/search.html>

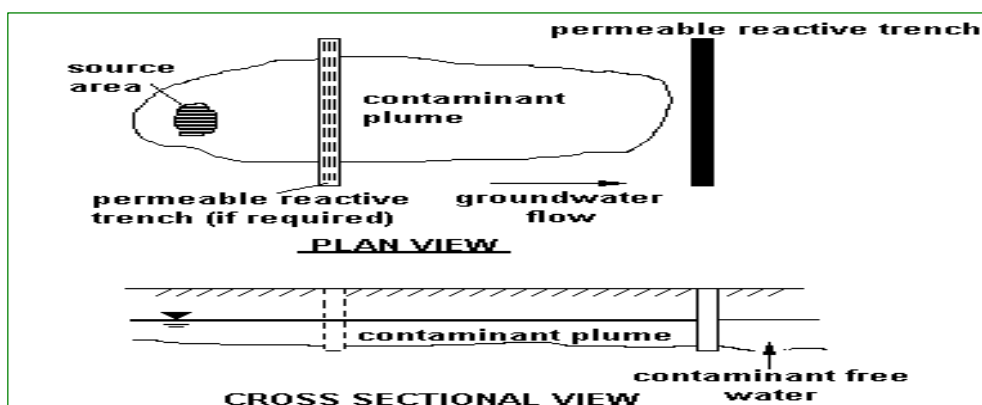
#### 4.4. **Reaktiv barriär**

Reaktiv barriär kan bestå av ett permeabelt material eller en hydrauliskt genererad zon i grundvattnet med vilken reduktion av föroreningskoncentration i och nedströms barriären underlättas. I de fall syftet är att underlätta biologisk nedbrytning i och/eller nedströms barriären kallas den Biologisk reaktiv barriär. I de fall barriären består av annat än enbart en vattenzon genererad av injektion/extraktion eller sparging (se ovan) brukar barriären benämnas reaktiv vägg (RV). Innehåller väggen ämne/-n som påskyndar biologisk nedbrytning erhåller anläggningen prefixet

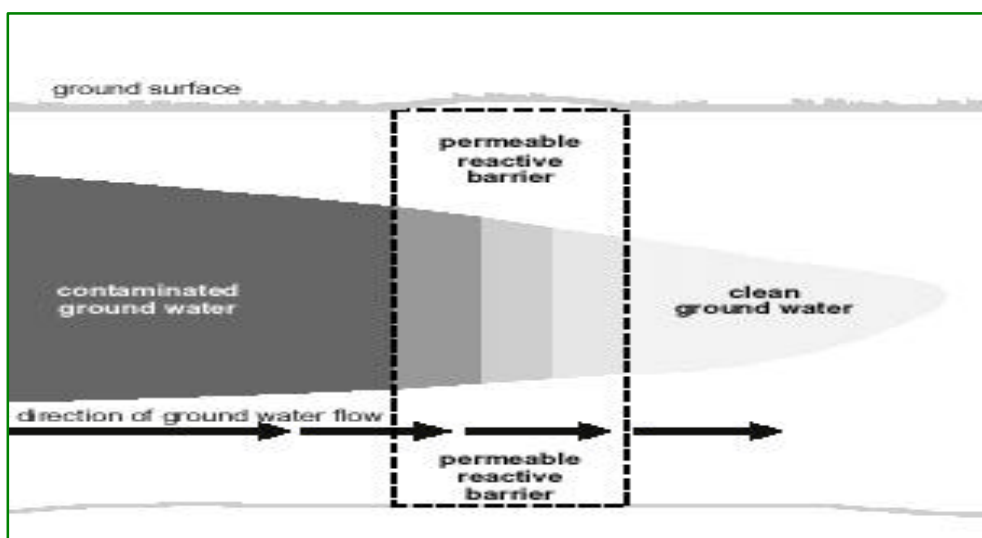
”Biologisk”. I fallet vägg föreligger i allmänhet inga behov av mekaniska system som upprätthåller barriären, dock kan tillfälligt behov föreligga att rena eller regenerera denna typ av barriär.

RV kan i huvudsak delas in i permeabla fyllda diken och trattsystem. Dikena, Figur 4.5 och 4.6, designas så materialet i diket täcker ett snitt av den förorenade plymen nedströms föroreningspunkten. Snittet täcker helt delen av den förorenade plymen, både vertikalt och horisontellt.

Huvudsyftet med en reaktiv vägg kan vara metallutfällning (t ex för att generera lämpliga elektronacceptorer för bionedbrytning eller om föroeningen är en metall immobilisera denna), metallkatalysering, mikrobiell kolonisering (av föroreningsnedbrytande mikroorganismer på ett bärarmaterial av t ex malda snäckskal; dock ingen info om denna i fullskala har gått att finna), vätgasgenerering med metall (järnspån för att öka halten elektrondonator till biologiska nedbrytningsreaktioner), kemisk oxidation, eller helt enkelt enbart förångning (i grus) eller adsorption (kol eller jonbytare). Olika typer av RV kan placeras efter varandra för att få bättre saneringseffektivitet.



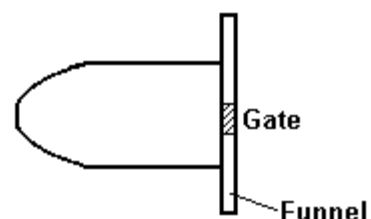
Figur 4.5. Reaktiv vägg i form av permeabla fyllda diken (från Grindstaff, 1998).



Figur 4.6. Permeabel reaktiv barriär; principskiss (<http://www.epa.gov/swertio1/products/moreinfo/prb.htm>, 2000-11-09).



Tratt-system ("funnel and gate"), Figur 4.7, designas så att icke-permeabla väggar styr föroreningsplymen mot permeabelt centrum av tratten där föroreningen tillåts passera genom en öppning. Efter att föroreningen passerat öppningen kommer den i kontakt med material och/eller mikroorganismer som reducerar/bryter ned föroreningen. Tratten kan sänkas ned till önskad nivå i grundvattenzonen. Ibland kan den behöva täcka främst nedre delen av zonen (främst då föroreningen är tyngre än vatten), ibland främst den övre (då föroreningen är lättare än vatten).



Figur 4.7. Reaktivt trattsystem (från Grindstaff, 1998).

Fastän de flesta barriärer är designade för lång operationell tid *in situ* med år av minimalt underhåll och utan extern energikälla, är det hittills inte känt hur deras funktion egentligen är under längre tid (US EPA, 2000e). Reaktiva barriärer med finkornigt metalliskt järn har visat sig kunna effektivt reducera lösta polymerer av klorerade kolväten (t ex trikloretylen). Metoden är inte lämpad för att omhänderta fri fas. Reeter *m. fl.* (1998) ger en beskrivning av användandet av reaktiv barriär med järn för sanering av klorerade kolväten.

#### 4.5. Naturlig självrening

Naturlig självrening (NS) baseras på naturliga processer i jord och grundvatten som reducerar föroreningshalten utan artificiellt ingripande (Larsson, 1998). Sådana processer inkluderar dispersion, sorption, förångning, abiotisk och biotisk omvandling och nedbrytning. Den del av naturlig självrening som baseras på biologisk nedbrytning erbjuder destruktion av förorening och är därför speciellt betydelsefull. Dessa processer måste kartläggas under en längre tid och data erhålls genom omfattande provtagning av grundvatten och jord i och kring det förorenade området. Målparametrarna måste väljas på ett relevant sätt och undersökas med tillräcklig intensitet under lämplig tidslängd så att erhållna resultat kan användas som input i en beräkning/modellering av föroreningsspridningen. Modelleringen utförs för att klargöra det förorenade områdets påverkan på omgivning och om naturlig självrening pågår och kommer att fortgå i området i tillräcklig grad och hastighet. Erhållna resultat ger ett underlag för miljömässig riskbedömning och för beslut avseende behov av sanering av området. Nyligen har modelleringsprogram tagits fram för screening av ett områdes potential för naturlig självrening av klorerade alifater (Aziz *m. fl.*, 1999). Sedan en tid tillbaks finns flera liknande program på marknaden för beräkning av naturlig självrening av petroleumprodukter, t ex Bioscreen (Groundwater Services, Inc., 1997). SGI (Statens geotekniska institut) planerar att i ett samfinansierat projekt med BFR (Byggeforskningsrådet) ta fram en handledning i naturlig självrening för svenska förhållanden (preliminär bedöms denna publiceras år 2002; målgrupp bl a konsulter och entreprenörer).

Redan i början av 1990-talet fann man överväldigande bevis på att naturlig självrening i grundvattnet kan fungera tillfredsställande i de allra flesta fall då föroreningen består av petroleumprodukter. Omfattande fältundersökningar under främst senare delen av 1990-talet har legat till grund för det numera accepterade förhållandet att även klorerade kolväten, under lämpliga förhållanden, kan genomgå naturlig självrening i tillfredsställande grad och hastighet. Att uppnå ställda miljökrav är dock betydligt mer sällsynt när det gäller klorerade alifater än för petroleumföroreningar. Detta beror på att de klorerade alifaterna kräver betydligt mer speciella och ovanli-

ga förhållanden än vad som gäller för petroleumprodukter. I båda fallen krävs att den naturliga självreningen till väsentlig del baseras på delfaktorn biologisk nedbrytning (se bl a *Natural Attenuation, 1998* och *Natural Attenuation, 1999*).

Naturlig självrening har under senare år i USA varit den mest använda metoden för sanering av tankområden förorenade med petroleumförorenat grundvatten och den näst mest använda för sådana områdens petroleumförorenade jordar. Fram till 1997 hade den använts i ca 17 000 områden med förorenat grundvatten och i ca 29 000 områden med förorenad jord, vilket motsvarade omkring 47 % respektive 28 % av totalt petroleumförorenade tankområdens grundvatten respektive jordar (*Tulis, 1997*). Vad gäller områden förorenade med klorerade alifater är metoden hittills använd vid betydligt färre tillfällen.

Naturlig självrening är vanligtvis avsevärt billigare än mer aktiva saneringsmetoder. För att klargöra om naturlig självrening kan nå uppställda saneringsmål krävs dock omfattande platsspecifika fältundersökningar avseende föroreningshalter, hydrologi, geokemi och mikrobiologi. Eftersom karakterisering av området ofta kräver sofistikerad provtagningsteknik, analysförfaranden och grundvattenmodellering är naturlig självrening till stora delar en "high tech" metod.

Normalt krävs att fri produkt först grävs upp och avlägsnas, och därefter kvartalsvis- till halvårsvis mätning av relevanta parametrar i tillräckligt antal punkter i främst grundvattnet under 1-3 års tid eller tills en definitiv trend avseende föroreningshalten är fastställd. Om resultaten visar att den naturliga självreningen är godtagbar behövs därefter ett efterföljande, men i betydligt mindre omfattning, kontrollprogram tills området kan avvecklas. Enligt *Tulis (1997)* rekommenderar US EPA (Amerikanska Naturvårdsverket) att minst de två första av följande tre bevis uppfylls för acceptans av naturlig självrening av petroleumprodukter (för klorerade alifater kan ev. alla tre krävas):

Primärt bevis: Historiska fältdata (grundvatten-/jordanalyser) som visar en klar och meningsfull trend av minskande föroreningsmängder och/eller koncentrationer av valda petroleumföreningar i lämpliga mätpunkter (punkterna föreligger framför allt i grundvattnet). Dessa data används för att få indikationer på att naturlig självrening pågår i tillräcklig grad, dvs för att bestämma om plymens utbredning minskar eller är stabil.

Sekundärt bevis: Inkluderar fältdata från karakterisering av det förorenade området som indirekt demonstrerar typ av naturliga självsaneringsprocesser i området och som visar den totala hastighet med vilken dessa processer reducerar föroreningshalterna (biologisk nedbrytningshastighet kan beräknas genom att mäta den tidsmässiga förändringen av bl a halter av speciellt utvalda petroleumkomponenter och elektronacceptorer i lämpliga provtagningspunkter).

Tertiärt bevis: Inkluderar undersökning i fält eller lab som direkt visar de platsspecifika mikroorganismernas aktiviteter och gemensamma förmåga att bryta ned föroreningen.

På senare tid har drivmedel erhållit oktanhöjande tillsatser, bl a i form av MTBE (metyl-tertiär-butyl-eter). Eftersom MTBE är svårnedbrytbart, samtidigt som det är mycket lösligt i vatten, är MTBE svårt att sanera med naturlig självrening. Nya forskningsrön i laboratorieskala har dock visat att det i vissa fall kan finnas mikroorganismer som har förmåga att bryta ned MTBE; se t ex *Bradley m. fl., 1999*; *US EPA, 1999*. I detta MTBE-sammanhang kan nämnas, även om det inte har direkt koppling till NS, att nya resultat från pågående fullskalesanering in situ med tillsats av syre och speciella MTBE nedbrytande bakterier, som i lab-skala halverade koncentrationen av

MTBE på  $\leq 2$  veckor, har visat att MTBE kunde brytas ned direkt *in situ* snabbare än vad enbart tillsats av syre åstadkom (*Salanitro m. fl.*, 2000).

#### **4.6. *In situ* jord tvätt**

Metoden innebär att en ämnesmix injekteras i förorenad omättad zon, mättad zon eller bådadera. Mixen kan bestå av t ex vatten och alkohol, ytaktiva ämnen eller baser (det sistnämnda för sanering av höga halter av t ex fenoler, inkl, klorerade dito). Målsättningen är att med denna mix lösa upp icke vattenlösliga organiska ämnen, t ex tyngre PAHer och oljor, i antingen hot spots eller i plymen nedströms så att de lättare kan pumpas upp eller brytas ned direkt *in situ*. Fysikaliska barriärer kan installeras för att motverka spridning. Extra god kartläggning och förståelse av grundvattenströmmar är nödvändig för att undvika spridning. Metoden är främst lämpad för jordar med låg silt eller lerhalt. Metoden är fortfarande i ett innovativt stadium och testas i USA på ett 5-10 tal platser (*US EPA 2000f; US EPA 2000g*).

#### **4.7. *Pneumatisk och hydraulisk spräckning***

Pneumatisk spräckning involverar injektion av högtrycksluft i förorenade konsoliderade sediment med avsikt att öka antalet sprickor/frakturer och bilda ett sekundärt nätverk av porer och kanaler. Härigenom ökas permeabiliteten för vatten och gas så att borttransport av föroreningar förbättras. Pneumatisk spräckning ökar härigenom bl a extraktion av gasfas och biologisk nedbrytning. Det sistnämnda ökas genom att transport av nedbrytningsstimulerande ämnen till bakterierna, transport av bakterierna till det förorenade området och borttransport av nedbrytningsprodukter, ökas (*US EPA, 2000c*).

Hydraulisk spräckning genereras genom att vatten först injekteras med högt tryck ned i botten av ett borrhål, för att skapa ett diskformat utrymme, från vilken spräckningen kan utgå. Därefter injekteras under högtryck en slurry av sand och gel ned i borrhålet varvid sandfyllda sprickor kan genereras i lågpermeabel, överkonsoliderad lera eller sediment. Gelen bryts snabbt ned biologiskt och kvarlämnar en högpermeabel sandfylld lins som kan vara så vid som 20 meter i diameter. Sprickorna underlättar biologisk nedbrytning av föroreningar, förbättrar möjligheten att föra ned uppvärmd luft och att pumpa upp förorening. Mätning av grundvattennivån och dess gradient före och efter spräckningen kan användas för att bedöma sprickornas vidd och var de är lokaliserade. Andra granulära material som t ex grafit, kan användas i stället för sand för att skapa sprickor med andra egenskaper (*US EPA 2000d*).

#### **4.8. *In situ* uppvärmning (ånginjektion och elektrisk uppvärmning)**

Metoden *In situ* uppvärmning ökar möjligheten att frigöra fastlagd förorening och kan utföras med t ex vattenånga. Föroreningarna avlägsnas genom kombinerad termisk förångning och mobilisering. Ångorna sugas upp genom en metod som i princip efterliknar SVE (soil-vapor extraction, se ovan). En relativt snabb och effektiv rening kan erhållas i både mättad och omättad zon. Metoden är lämpad för områden förorenade av främst tyngre organiska föroreningar och organiska föroreningar som är relativt hårt fastlagda. Risken för mobilisering av föroreningarna i form av kondensat vid det termiska fronten innan de tagits upp kan vara ett problem och är inte ännu väldefinierad. Metoden kan ibland kräva täckning av ytlagret och däri omhändertagandet av gaser. Metodens begränsningar inkluderar dålig effektivitet i jordar med låg permeabilitet och hög heterogenitet. Metoden kan kopplas till elektrisk uppvärmning *in situ* av fin-

korniga lager (resistans uppvärmning, mikrovågsuppvärmning, radiofrekvensuppvärmning) varvid ökad saneringseffektivitet kan erhållas.

#### **4.9.      *Kemisk in situ oxidation***

Metoden innebär att oxiderande ämnen injiceras i det organiskt förorenade området med avsikt att kemiskt oxidera och sönderdela föroreningen. Oxidationsmedel, ofta i form av kaliumpermanganat och väteperoxid, tillsätts i vatten som pumpas ned *in situ* så att området flödas igenom. I princip kan alla organiska ämnen oxideras med starka oxidationsmedel till koldioxid och vatten. Processen är inte specifik, alla befintliga ämnen *in situ* inklusive föroreningarna kan bli oxiderade. Så till exempel kan även naturligt organiskt material oxideras vilket då ökar behovet att tillsätta än mer oxidationsmedel för att få tillfredsställande oxidation av förorening. Även redoxförhållandena är en viktig faktor, vilken påverkas av befintligt pH. I vissa fall krävs starkt sura förhållanden för att tillräcklig oxidation skall ske. Så är fallet vid användandet av Fentons reagens vid vilket väteperoxid och järnjoner (i form av järnsulfat) bäst verkar vid pH 2-4.

Oxidationsmedlet, t ex natriumpermanganat och väteperoxid (med eller utan järnjoner), i vatten tillsätts med fördel till områden som är förorenade med tyngre svårslösliga ämnen, t ex tyngre PAH och högklorerade alifater. I det sistnämnda fallet bildas, förutom koldioxid, vatten och biprodukter, även klorid. I vissa tester har enbart kaliumpermanganat i vatten används för att oxidera högklorerade alifater, men laboratoriestudier indikerar att det då nästan enbart går att oxidera omättade bindningar (*Pankow och Cherry, 1996*).

Det är mycket viktigt att distributionen av oxidationsmedlet sker så optimalt som möjligt. Oxidation och/eller förändring i pH kan generera utfällning som kan täppa igen både kring utlopp för tillförsel av oxidationsmedel och den förorenade jorden i sig. Tekniken är olämplig att användas i jordar som redan från början har låg permeabilitet. Dessa faktorer är inte minst viktiga vid användandet av väteperoxid där det är nödvändigt att distributionen ut i det förorenade området sker snabbt, eftersom sönderdelning av väteperoxiden sker snabbt. Väteperoxid har normalt en halveringstid i vatten av enbart några timmar.

#### **4.10.     *Hydraulisk inneslutning***

Hydraulisk inneslutning kan utnyttjas vid krav på snabba åtgärder i akuta föroreningssituationer. Med metoden styrs grundvattnet i önskad riktning genom att på lämpligt sätt sänka eller höja grundvattennivån med hjälp av pumpbrunnar eller diken. Olämplig spridning av fri oljefas och olja i grundvattenzonen förhindras och därmed skapas mer tid för sanering av föroreningen. Förorenad jord påverkas ej av åtgärderna.

Om grundvattenytan ligger mindre än ca 3-4 m från markytan kan öppna diken eller nedgrävda horisontella dräner användas för att påverka grundvattnets strömning (*Testa och Winegardner, 1991*). Vid större djup och där de yttre förutsättningarna (utrymme, miljö, säkerhet m m) inte tillåter diken, används brunnar. Brunnarna installeras med hänsyn till de hydrogeologiska förutsättningarna.

Pumpning av vatten kan antingen ske med sugpump eller med dränkbar tryckpump. Om sugpump används ansluts alla brunnar till en gemensam ledning. Med sugpump kan grundvattenytan maximalt sänkas ca 6-7 meter. Med dränkbara pumpar kan grundvattenytan sänkas betydligt mer. En dränkbar pump placeras då i varje brunn och brunnarna sammankopplas till en gemen-

sam ledning. Tryck- och sugpump kan också användas i kombination, med tryckpumpen placerad i brunnens botten och sugpumpen på markytan. Sugpumpen används då för att skapa ett vakuum i brunnen vilket i kombination med den dränkbara pumpens övertryck uppfordrar vattnet. Om även fri olja ska samlas in i brunnen ska filtret placeras i eller strax under den statiska olje/vattenytan, (*Concawe, 1979*). Ett kostnadseffektivt alternativ till normala grundvattenbrunnar i tätare jordarter och vid ytliga föroreningar är så kallade well-points. Dessa är smala rör, 5-10 cm i diameter, med ett perforerat filter på ca 0,3-1 meters längd, *Handboken Bygg (1984)*. Rören är försedda med ett spolmunstycke längst ner för att med detta kunna föras ned i jorden vid installation.

Hydraulisk inneslutning är tillämplig för att förhindra vidare spridning av ren oljefas och förorenat grundvatten i framförallt genomsläppliga och måttligt genomsläppliga jordar med permeabilitet större än  $10^{-6}$  m/s. I mycket permeabla områden som rullstensåsar kan det dock bli problem eftersom mycket stora insatser (flera stora brunnar med mycket kraftiga pumpar) måste göras på grund av det stora flödet. Om brunnar används istället för diken kan tekniken i princip appliceras oberoende av djup till grundvattenytan. Brunnar, eller well-points, är i många fall att föredra framför öppna diken (*Testa och Winegardner, 1991*).

Hydraulisk inneslutning är en förhållandevis enkel teknik som endast kräver normalt förekommande utrustning som brunnar, pumpar m m. Modeller och dimensionering av systemet är också välkänd teknik. Vad som däremot kräver stor skicklighet är undersökning och karakterisering av områdets hydrogeologi. Inom detta område är det önskvärt med ytterligare forskning kring användandet av geofysiska metoder, permeabilitetsmätning *in situ* och statistisk variation av hydrogeologiska parametrar. Metoden har mycket hög tillgänglighet eftersom flertalet tekniska konsulter och entreprenörer arbetar med tekniken.

## 5. RESULTAT FRÅN UTVALDA *IN SITU* METODER I PILOT- OCH FULLSKALA

Kapitlet behandlar resultat från sanering av klorerade alifater (här valda med max tre kolatomer), osubstituerade alifater (här exklusive alkyner) och aromater (monoaromater och PAH). De metoder som behandlas här är de som ansetts mest lämpade att användas *in situ*, främst då biologiska men även till del andra. De flesta resultaten är från saneringsutföranden i aerob (syrerik) miljö. Både aeroba (med syre) och anaeroba (syrefri) behandlingsresultat tas upp i förekommande fall (gäller främst behandling av klorerade alifater).

Generellt sett har biologisk behandling av organiskt förorenad mark flera fördelar gentemot andra metoder. Wang m. fl. (1990) jämförde toxiciteten av PAH-förorenad jord före och efter biologisk behandling i lysimeterfält. Man fann att jorden initialt visade stark mutagenitet och toxicitet. Efter 20 veckors biobehandling hade jorden fullständigt avgiftats. Man erhöll toxikologiska värden av den behandlade jorden som låg på samma nivå som bakgrundsvärdet i normal, ej förorenad, jord. Biologisk behandling resulterar i en nedbrytning av föroreningarna till i de allra flesta fall ofarliga substanser, på ett sätt som är mycket svår att åstadkomma med kemisk/fysikaliska metoder. Toxiciteten minskar också med tiden till följd av att resterande förorening tränger in i det finaste porsystemet, ofta in i partiklarna, så att biotillgängligheten minskar (Nakles m. fl. 1997).

### 5.1. Sanering av alifater

Drivmedel innehåller normalt olika blandningar av organiska ämnen, främst alifater och aromater. Eftersom en mycket stor andel av de petroleumprodukter som påträffas i mark och vatten härrör från drivmedel av olika slag, föreligger alifater härav i stor utsträckning tillsammans med aromater i petroleumförorenade markområden. Det är alltså sällsynt att ett område enbart är förorenat av alifater. Till de drivmedelsprodukter som innehåller stor andel alifater hör diesel. Som framgår av kapitel 6.2 är alifater av typen medeltunga n-alkaner i diesel lättnedbrytbara under aeroba förhållanden. Detta innebär att i markområden där förorening av diesel befunnits en längre tid är det inte ovanligt att dessa n-alkaner har försvunnit. Man kallar resterande produkt för "vädrad diesel" som dock fortfarande kan innehålla bl a andra typer av alifater (cykloalkaner, grenade alkaner, tunga n-alkaner etc).

Information avseende mikrobiell in-situ sanering av diesel och bensin i jord och grundvatten har tidigare publicerats i Lindmark och Larsson (1995). Nedan följer därför främst information gällande efter 1995, varav först ges exempel på mikrobiell sanering *in situ* av diesel, varefter resultat från sanering av andra petroleumprodukter tas upp.

Fokus ligger i detta kapitel främst på alifater. På grund av drivmedel-alifatens relativt låga löslighet i vatten brukar grundvattnet vid ett sådant förorenat område till liten andel innehålla lösta alifater. Eftersom därtill deras densitet är lättare än vatten föreligger alifatiska föroreningar typiskt i jorden ovan grundvattenytan, på grundvattenytan, i den sk "smear zone", dvs i jorden i det intervall inom vilket grundvattenytan under året fluktuerar, och strax under dess lägsta säsongsnivå.

Det är allmänt känt att aerob biologisk nedbrytning av diesel fungerar och hög saneringsgrad kan nås relativt snabbt (främst beroende på dess höga andel n-alkaner). Utförs saneringen *in situ* är dock saneringshastigheten beroende av bl a halten befintligt syre och gödningsämnen och hur väl

gödningsämnen och syre kan tillföras det förorenade området. I allmänhet, ju finkornigare materialet är desto sämre möjligheter att dessa ämnen kan transporteras effektivt *in situ*. Föreligger diesel i lera måste speciella och innovativa angreppssätt därför utnyttjas för att nå tillfredsställande saneringsgrad inom acceptabel tid. Eftersom lera och silt föreligger i betydande omfattning i Sverige ges nedan exempel på sanering av diesel i just sådana områden.

Exempel på lyckad mikrobiell *in situ* sanering av diesel-förorenad låg-permeabel jord är beskrivet av *Chitla och Portier (1997)*. Jorden var av typen siltig lera med permeabiliteten  $10^{-7}$  m/s. Ca 5000 m<sup>2</sup>, med varierande föroreningskoncentrationer ned till 4 µg/l, hade förorenats av läckande rörsystem kopplat till underjordiskt tanksystem. Maximala halten av petroleumkolväten (TPH-diesel) uppmättes till 10 g/kg i slit-leran 2,65 m u my. Grundvatten-nivån fluktuerade under saneringstiden mellan 1-2,2 m u my. Föroreningen befanns mängdmässigt sett främst föreligga i den sk "smear zone". Grundvattenflödet uppskattades till  $9 \cdot 10^{-5}$  m/dag och hydrauliska gradienten till 0,003.

På grund av pågående aktiviteter ovan mark (rastplats för lastbilar) beslutades att området skulle genomgå *in situ* sanering, inkluderande pneumatisk spräckning av den låg-permeabla silt-leran. Därtill skulle tillsättas ett specialbehandlat diatomärt material (Isolite®) med hög ytarea (dess porstorlek var ned till 0,1 µm). Spräckningen utfördes genom att pressa ned sonder som distribuerade luft in i den siltiga leran med ett tryck av 3,5 kg/cm<sup>2</sup>. I de sprickor som man härav genererade tillfördes det diatomära materialet, vars ytor dessförinnan hade belagts med en bakteriekultur. Denna bakteriekultur hade framtagits genom att först ta upp markprover från det förorenade området. Ur markproverna odlades de bakterier upp i stort antal som utnyttjade diesel som föda, varefter dessa bakterier immobiliserades på det diatomära materialet. Tillsammans med detta material tillfördes även näringsämnen, i form av kväve och fosfor, in i sprickorna. Målsättningen med spräckningen var i övrigt att underlätta transport av syre, bakterier och näringsämnen i silt-leran och att öka möjligheten att hålla rätt fukt-/vattenhalt i området.

Förutom den vertikala spräckningen borrades även ett 20-tal horisontella rörformade håligheter i vilka tillfördes samma typ av behandlat diatomärt material (se ovan). Håligheterna borrades parallellt 1,4 m u my med 3 m mellanrum över det hög-förorenade området, resulterande i totalt 2150 m rörformade håligheter. I dessa håligheter tillfördes även luft/syre (med 116 liter/sek) och gödningsämnen. Initialt levererades dessa gödningsämnen i speciella mikrokapslar som kontinuerligt lakade ifrån sig ämnena till jorden. Dessa kapslar hade tillförts håligheterna tillsammans med det diatomära materialet. Man hade uppskattat att området behövde renas från ca 1,9 ton kolväte och man ansåg att det skulle räcka med att totalt tillföra 160 kg N (kväve) och 16 kg P (fosfor) till området. Efter en tid tillfördes periodvis näringsämnena i vätskeform in i det rörformade systemet, för att upprätthålla halter i jorden om minst 40 mg/kg N och 4 mg/kg P.

Saneringen utfördes under ett år och provtagning för att mäta saneringsgraden utfördes periodvis både som stratifierad och slumpmässig provtagning (inom 16 m<sup>2</sup> kvadrater). Riktvärdet för ren mark var 500 ppm TPH-diesel vilket nåddes efter 170 dagar, med undantag för ett delområde. Efterforskningar avseende orsak till den dåliga saneringsgraden i detta område visade att syretillförseln inte var optimal p g a sprickor som bildats och som "kortslöt" de parallella håligheterna. Den största orsaken till delområdets dåliga saneringsgrad berodde dock på att delområdet under saneringen i liten men betydelsefull utsträckning tillfördes ny diesel från den lastbilsverksamhet som pågick ovan jord och därtill från en tidigare ej uppmärksammas brusten ledning. Detta mindre delområde åtgärdades genom uppgrävning. Efter 360 dagar hade hela områdets ursprungliga medelhalt reducerats med 98 % till  $64 \pm 118$  mg/kg. Med denna metod utfördes sane-

ringen upp till 75 % billigare än om alternativet uppgrävning och deponering skulle ha utförts för hela området.

Angående användandet av ovanstående nämnda metod pneumatisk uppspräckning i områden med petroleumförorenad lera för att underlätta biologisk nedbrytning, måste sådan uppspräckning ske i tillräcklig omfattning så att god distribution av syre och eventuellt andra nedbrytningsstimulerande ämnen erhålls. *Ventkatraman m. fl. (1997)* ger information om modellberäkningar som kan användas för att erhålla lämplig influensradie.

*Waltz och Ricotta (1997)* beskriver en metod som de utvecklat och använt på tre olika petroleumförorenade områden, som alla hade det gemensamma att de bestod av låg-permeabel lera. Kolvätekoncentrationerna låg mellan 700 – 13 000 ppm i leran. Man borrade ett antal hål vertikalt och tillsatte kalciumperoxid ( $\text{CaO}_2$ ) och vatten (slurry), varvid CaO (kalciumoxid) och syre bildades *in situ* (reaktionerna kan pågå veckor till månader). Härvid erhöles både ökad syrehalt *in situ* samtidigt som CaO gjorde området mer permeabelt för en efterföljande bioventing. Bioventing startades några dagar i härför avsedda borrade hål efter att slurry-tillförseln slutförts. Under ovanstående kemiska produktion av syre var pH relativt högt (pH 10-11) men omgivande leras buffrande effekt tillsammans med tillfördel av natriumfosfat och kaliumfosfat sänkte pH till en nivå lämplig för bakteriell nedbrytning av petroleum. Därtill tillfördes petroleumnedbrytande bakterier (sannolikt platsspecifika) i det fall man ansåg detta lämpligt för att upprätthålla den mikrobiella nedbrytningsaktiviteten. Områden som initialt hade mer än 10 000 ppm kolväten erhöles en reduktion till mindre än 100 ppm inom 6 månader.

Det kan i detta sammanhang nämnas att även andra ämnen som frisätter syre relativt långsamt finns på marknaden. ORC® (oxygen release compound), som främst består av magnesiumperoxid, har använts med varierande resultat (främst lyckade) vid sanering av petroleumförorenade områden (se sidorna 277-306 och sidorna 319-324 i *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. *In Situ* and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April, 1999).

Det är inte ovanligt att diesel föreligger tillsammans med andra, något tyngre, petroleumprodukter. De tyngre produkterna, t ex brännolja, har normalt låg förångningskaraktistik och låg löslighet i vatten och föreligger därför i avsevärd grad i omättad zon, inkl. den kapillära zonen, och i övre delen av grundvattnet (bl a som fri produkt). Vanlig luft-/biosparging och bio-/venting brukar långt ifrån alltid ge acceptabelt saneringsresultat. Kopplas dessa metoder till *in situ* uppvärmning ökar möjligheterna att saneringen kan ske i tillfredställande grad och hastighet. Exempel på sådant utförande ges av *Dablow m. fl. (1997)*. Jord och grundvatten ned till ca 30 m u my var förorenat upp till ca 40 000 ppm med en blandning av 80% dieselbränsle (No. 2), 18% brännolja ("No. 6 fuel oil") och < 2% bensin. Blandningen var viskös (400 cp) med en densitet av 0,953 och hade låg förångningskapacitet (ångtryck 0,015 mm Hg). Över 95% av den 260 ton sanerbara föroreningen förelåg adsorberad och som fri fas. Grundvattennivån varierade starkt på grund av områdets placering vid havet (försvarsmaritimt centrum) med kraftiga tidvatteneffekter och därtill av tömning/fyllning av stor naturlig fartygsdocka (torrdocka).

Ett system med luftsparging och ång-/vätskeextraktion kopplades till *in situ* uppvärmning med ånga som höjde temperaturen upp till ca 100 °C i omättad zon och i övre delen av grundvattnet. Föroreningens viskositet minskade till ca 30 cp. Trots att temperaturen höjdes markant erhöles indikationer på biologisk nedbrytning (både aeroba och anaeroba genom uppmätta syre-/CO<sub>2</sub>-halter och metan i utgående luft). Laborrietester hade innan visat att oro för fullständig avdödning av petroleum-nedbrytande mikroorganismer genom tillförsel av ånga var obefogad (de



organismer som överlevde förelåg hypotetisk främst i små porer med betydligt lägre temperaturer). Under de första sex månaderna hade ca 113,5 m<sup>3</sup> av produkten sanerats, varav uppskattningsvis ca 6 % genom mikrobiell nedbrytning (varav majoriteten anaerobt, indirekt kalkylerat genom uppmätt metanproduktion).

Man kan ibland missta sig på hur väl sanering *in situ* har gått. Detta gäller inte minst då man direkt efter att ha utfört *in situ* saneringen erhållit analysresultat som indikerat att området är rent (främst baserat på gasprover). Det har hänt att när man upprepat provtagning efter någon/några månader så har nästan lika höga koncentrationer detekterats som innan man började sanera. Denna effekt kan hypotetiskt bero på bl a föroreningsens relativt långsamma diffusivitet ut i porgasen från det aktuella fallets material. Det är härav betydelsefullt att initialt undersöka med vilken hastighet diffusionen sker ut i gasfas innan man designar fullskaleutförandet. Härvid kan resultaten indikera att det kan räcka med mindre gasflöde än man tidigare planerat och/eller att pulsering av gasflödet kan vara gynnsamt ekonomiskt sett och lika effektivt som kontinuerlig lufttillförsel.

En annan orsak till dålig saneringseffektivitet är att det kan bildas kanaler *in situ* under saneringens gång som kortsluter områdets luft-/syretillförsel brunnar. Vidare, i grundvattnet kan kontinuerlig tillförsel av luft generera en zon med lägre permeabilitet som i sin tur kan divergera grundvattenflödet runt det förorenade området. Härav kan sanering av det förorenade området komma att fördröjas. I detta fall kan pulsering av luft/syretillförsel i grundvattnet vara fördelaktigt. *Hartley m. fl. (1999)* ger exempel på hur man kan genomföra pulserad tillförsel av luft/syre vid luft/biosparging.

I övrigt, tillsats av bakterier för att försöka påskynda nedbrytning av kolväten har, enligt rapporter, givit varierade resultat. Flertal har redovisat att sådan tillsats till petroleumförorenat material givit enbart marginella eller rent av negativa effekter. Det senare fallet gäller främst då bakterierna inte kommit från det förorenade området ("icke-adaptade"). Enzymer för nedbrytning av n-alifater finns troligtvis i så gott som alla typer av bakterier, vilket inte synes gälla för de flesta andra kolvätena i drivmedel. Om ett förorenat material redan innehar stort antal bakterier/volymsenhet finns alltså där ofta tillräcklig potential för nedbrytning av n-alifater. Område, färskt förorenat med petroleumprodukter, brukar normalt snabbt uppvisa kraftig tillväxt av bakterier som bryter ned n-alkaner.

Jord kan dock inneha lågt antal om bl a låg halt gödningsämnen, hög halt av mikrobiella bakterieätare bland annat sk Protozoer (*Harvey 1991; Harvey m. fl, 1995; Kinner m. fl., 1998*), betydande halt av tungmetaller och/eller andra toxiska ämnen, föreligger. Dessa faktorer gäller i än högre grad i vatten eftersom vatten därtill normalt innehar avsevärd mindre antal bakterer per volymsenhet än jord. I petroleumförorenat vatten med låg koncentration av bakterier, adapterade till omgivningens förutsättningar, kan dock i vissa fall erhållas en förbättring av saneringseffektiviteten genom tillsats av icke-adaptade bakterier (kan bl a bero på att de tillsatta bakterierna då har mindre antal naturligt befintliga konkurrenter). Bättre effekter erhålls dock normalt om petroleumnedbrytande bakterier tas från det förorenade området, odlas upp och återinsätts till det förorenade materialet. Dessa är bättre rustade, adapterade, att klara av den miljö i vilken föroreningarna föreligger, i förhållande till andra bakterier som kommer från andra förhållanden. Hypotetiskt kan därtill de icke-adaptade bakterierna vid tillsats till ett petroleumförorenat material i värsta fall konkurrera ut de naturligt föreliggande adapterade föroreningsnedbrytande bakterierna som redan finns i materialet (*Møller m. fl., 1995; Marquez-Rocha m. fl., 1999; Dernbach L., 1999; Buzea och DeStefanis, 1999*).

I motsats till behandling av n-alkaner i jord, kan det i vissa fall, t ex för föroreningar av typen klorerade kolväten eller PAH, vara till fördel att tillsätta speciella bakterier. Orsaken är att mikroorganismer, med enzym att bryta ned dessa typer av föroreningar, föreligger mindre allmänt, jämfört med alifater. Även i detta fall är det dock bäst om bakterierna är platspecifika.

Andra viktiga faktor är bl a hur väl tillförda bakterier kan transporteras (både av sig själv och av yttre omständigheter) i det förorenade materialet. Det är inte ovanligt att tillsats av bakterier *in situ* enbart resulterat i en spridning i storleksordning någon-några decimeter kring tillförselpunkten. Orsaken är bl a att bakterierna i vissa fall inte har eller använder egna framdrivningsmekanismer. Därtill kan bakterierna använda "gripdon" för att fästa sig på första bästa materiyta (Harvey 1991). Vidare, bakteriens storlek är avgörande för dess förmåga att transportera sig i vattenmättad jord och storleken beror, förutom på typ av bakterie, på om den är i svältstadium, tillväxtstadium etc. Ytterligare betydelsefulla faktorer är tillförselhastighet och omgivningens jonstyrka; hög jonstyrka och hög flödes hastighet synes försvåra transport (Logan m. fl., 1997; Camesano och Logan, 1998) (se även kapitel 5.3 nedan om klorerade alifater). Sådana faktorer kan resultera i att området i en tillförselpunkt "pluggas igen" av tillförda bakterier, med mycket försämrad bakteriedistribution som följd. Det betydligt bättre alternativet för *in situ* behandling är att redan från början använda bakterier som alltså även har goda distributionsegenskaper. Vid övervägandet av att använda tillsats av bakterier är det härav av betydelse att man innan erhåller bevis på (lab eller i pilotskala) att sådan tillsats verkligen kommer att ge önskad effekt och är värt den extra kostnad som sådan tillsats ofta innebär.

## 5.2. Sanering av monoaromater och polyaromater

Vid sanering av markområden förorenade med monoaromater (MAH) har främst *in situ* metoderna naturlig självrening, bioventilering, ventilering och air sparging använts. I de fall uppgrävning lämpat sig ekonomiskt och tidsmässigt, har *ex situ*-kompostering använts. Markområden förorenade med polyaromatiska kolväten (PAH) har främst sanerats med *ex situ* metoder, varvid förorenade jord och ev fri produkt tagits upp i samband med sanering. Kreosotförorenade jordar har tidigare främst sanerats med slurry-reaktormetoden, i de fall jordens kornstorleksfördelning varit lämplig. På senare tid har emellertid *in situ* låg-temperatur uppvärmning (LTTD; low-temperature thermal desorption) av sådan jord blivit en eftertraktad metod (US EPA, 1998). Med LTTD förångas föroreningarna från jorden via indirekt uppvärmning med ånga som injekteras, varvid föroreningarna samlas upp i gasfas och omhändertas. I *in situ* fallet placeras rör i en cirkel kring det förorenade området i vilka ånga injecteras ned i jorden. Förorenat grundvatten omhändertas på liknande sätt, ånga injekteras ned i grundvattnet. Uppumpat förorenat grundvatten, ångor och kondensat processas genom värmeväxlare, varefter de avkylda föroreningarna pumpas över till en förbränningsenhet (Eaker, 1998). Rajan och Hayes (1997) och Leuschner m. fl. (1997) ger exempel på användandet av en LTTD-liknande metod (CROW™) som ingick i ett sk behandlingståg för sanering av ett koltjäreförorenat område.

Orsaken till LTTD-metodens popularitet är bl a att metoden kan användas på ett brett spektrum av jordtyper, medan reaktormetoden främst varit begränsad till jordar med relativt lågt finmaterialinnehåll. Till slurryreaktions fördel skall dock sägas att det (ofta hos entreprenören) inte funnits tillräckliga kunskaper för att styra och optimera de mikrobiella och fysikaliska processerna i slurryreaktorn. Det har även ofta inte funnits kunskaper om att uppskalningseffekter från lab- och pilot- till fullskala kan ge negativa processeffekter. Om man inte känner till dem och inte vet hur man i förväg kan undvika dem så brukar allvarliga problem uppstå, varvid själva metoden kan få obefogat dåligt rykte. Det kan inte nog betonas vikten av att involvera kemiingenjörer,

mikrobiologer och biokemister vid design av sådana reaktorer och vid igångsättandet och drift av sanering av organiskt förorenade jordar med bioreaktorer.

Nedan följer en kortfattad sammanfattning av tidigare inhämtade erfarenheter (*Larsson m. fl., 1994*) av *in situ* behandling av aromatförorenade markområden, vilka presenteras tillsammans med nya rön avseende sanering av sådana markområden i pilot- och fullskala.

Sanering *in situ* av MAH har främst varit aktuellt vid läckande underjordiska tankar innehållande drivmedel (bensin mm). På senare tid har, då MAH förelegat i grundvattnet, i de allra flesta fall naturlig självrening (NS) används. *In situ* sanering av MAH-förorenad jord har främst utförts med a ventilering/bio-ventilering eller SVE (soil-vapor extraction). NS-undersökningar har vanligen utförts i områden med relativt tempererade grundvatten. Emellertid föreligger bevis på att NS även kan fungera tillfredsställande i arktiska områden med BTEX-förorenat grundvatten. I Fairbanks, Alaska, upptäcktes i slutet på 1980-talet att underjordiskt tanksystem läckt ca 150 m<sup>3</sup> arktisk diesel (innehöll 8 % BTEX och trimetylbenzen) till omkringliggande jord och till grundvattnet (okänd temperatur) (*Westervelt m. fl., 1997*). Upptäckten gjordes i samband med installation av dricksvattenbrunnar ca 90 m från utsläppet. Vid första provpumpningsomgången detekterades 2,1 µg/l bensen och 1,3 µg/l toluen i vattnet (ca 4,6 m u.m.y). Man genomförde därefter periodvisa undersökningar med a p NS och modellerade resultaten. Analyser och modelleringar visade bl a att omfattande biologiska nedbrytningsprocesser pågick, att BTEX-halterna från och med 1991 (fram till senaste provomgång 1996) låg under detektionsgränsen på 0,2 µg/l och att dricksvattentäkten även i framtiden ej skulle bli hotad tack vare goda förhållanden för NS.

Även om NS numera är den internationellt förhärskande saneringsmetoden för BTEX förorenat grundvatten används även andra metoder. Exempel på dessa ges i det följande.

Erfarenheter från användandet av luftsparging i 32 fall för sanering av bl a BTEX i grundvattenzonen visar bl a att det är viktigt att placera grundvattenrören rätt, att föroreningskoncentrationerna kan öka markant igen efter ett antal månaders uppehåll, att metoden bättre sanerar löst fas än adsorberad fas och att ca 1/3-del av saneringarna inte var lyckade (*Bass och Brown, 1997*). Detta kan ske bl a då området innehåller höga föroreningshalter. *Kraus m. fl. (1997)* installerade 27 gv-rör i ett starkt etylbensen- och xylene-förorenat markområde (upp till 41 mg/l etylbensen och upp till 150 mg/l xylen; jorden ovanför uppvisade i storleksordning tiotals g/kg (upp till 25-71 g/kg) av dessa ämnen). Grundvattenytan låg i ett 0,6 m skikt av sandig silt / siltig sand som i sin tur låg på en betydligt mäktigare skikt av sand. Man nådde efter ca 23 månaders behandling, inklusive uppehåll för vinter, ingen statistiskt signifikant reduktion av etylbensen och xylen i jorden. Reduktion i grundvattnet var då ca 3-4 tiopotenser. Efter vinteruppehållet erhöles stark återgång av föroreningshalterna upp mot ursprungliga nivåer.

En annan aktiv saneringsteknik för bl a BTEX-förorenade grundvatten är injektions-, extraktionssystem. Metoden är beskriven i kapitel 4.1 och kan sammanfattas enligt följande. Delvist förorenat grundvatten pumpas upp nedströms det förorenade området. Uppumpat vatten renas vid behov i bioreaktor eller genom filter, varefter vattnet återförs *in situ* uppströms eller i det förorenade området. Till vattnet som återförs kan vid behov tillsättas bionedbrytningsstimulerande ämnen, t ex syre, näringsämnen och bakterier från bioreaktorn (vattenfasreaktor). *In situ* sker biologisk nedbrytning av föroreningarna. I det uppumpade vattnet följer ännu icke nedbrutna föroreningar med, som då omhändertas/bryts ned i bioreaktorn. Om nedbrytningen sker i tillräcklig grad *in situ* behövs ingen bioreaktor och metoden övergår då till ren grundvattencirkulering. Enbart cirkuleringen i sig kan öka beakterietillväxten *in situ* (*Montgomery m. fl., 1997*).

Bio-ventilering (BV) används i omättad zon och är troligtvis betydligt mer vanlig som saneringsmetod för drivmedel än luftsparging (som används i grundvattnet). BV är idag allmänt accepterad som en kostnadseffektiv saneringsmetod för att reducera flyktiga kolväten i omättad zon, i de fall den är lämpad. Emellertid är ett effektivt utförande relativt komplicerat att designa p g a platsspecifikt samspel mellan fysikaliska, kemiska och biologiska processer. Tex har masstransportbegränsningar mellan vätska och fast fas och mellan vätska och gas visat på metodens begränsningar (Cho och Jaffe, 1990; McClellan och Gilham, 1992). Exempel på andra begränsande faktorer är permeabilitet och tillförsel hastighet. Ju lägre permeabilitet i jorden desto mindre influensradie från varje enskild brunn och desto fler brunnar krävs med ökade kostnader som följd. Tillförsel hastigheten av gasen är delvis kopplad till bionedbrytnings hastigheten. Ju större tillförsel hastighet, utöver vad som krävs för optimal bionedbrytning, desto mer övergår metoden i ren ventilering. Vid ventilering brukar bl a masstransportbegränsningarna göra sig än mer gällande.

Brouman m. fl. (1997) beskriver användandet av ett Tratt-system ("funnel and gate"), i kombination med grundvatten-cirkulering och biologisk *in situ* nedbrytning. Avsikten med denna kombination var att förhindra vidare spridning av kreosotämnen *in situ* vid ett träimpregneringsförorenat markområde. Enligt författarna kan kombinationen vara saneringsmässigt och kostnads- mässigt effektiv.

Integrerat angreppssätt för att *in situ* sanera MAH- och PAH- förorenad mark kan t ex innefatta extraktion av gasfas (SVE, Soil Vapor Extraction) och/eller bio-/ventilering kopplat till luftsparging (AS, "air sparging", luft-/syreinblåsning i grundvattnet) och till uppumpning av vatten för behandling *ex situ*. AS används främst kopplat till SVE varvid föroreningar i gasfas, som undgår extraktionsrören och som istället sipprar upp ur jorden, tas omhand genom täckning av marken med ett impermeabelt material varifrån föroreningar sugts ut och omhändertas. AS kan även designas som en "Mikrobiologisk vägg" (Microbial fence). I detta fall placeras luftinjektionsbrunnarna i linje en bit nedströms områdets hot spots, för att förhindra vidare spridning av föroreningarna nedströms. Exempel på sådant integrerat behandlingssätt ges i Buzzelli m. fl. (1997).

Om förorenat vatten skall saneras *in situ* under aeroba förhållanden (gäller PAH men kan även appliceras på andra organiska föroreningar som önskas brytas ned aerobt) kan vattnet mättas med syrgas, luftsyre, ozon (O<sub>3</sub>) eller väteperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Används ren syrgas, ozon eller väteperoxid istället för luft erhålls högre andel syre i vattnet. Kostanden är dock avsevärt lägre om luft används.

Försök med biologisk *in situ*-sanering av ett PAH-förorenat markområde kopplat till användandet av väteperoxid har genomförts i Sverige under ca 2 1/2 år, med avbrott under vintrarna (SNV, 1993). Näringsämnen (N och P), ytaktiva ämnen, enkla kolkällor som sirap, och mikroorganismer tillsattes *in situ* när så ansågs lämpligt. Initialt tillsattes väteperoxid till det cirkulerande vattnet, men tekniska problem gjorde att man efter ca två år övergick till syrgas. Initiala PAH-halter uppmättes i jord till maximalt ca 45 000 mg/kg TS (låg molekylära PAH; medel av total PAH i jord ca 29 000 mg/kg TS), i sediment till maximalt ca 79 000 mg/kg TS (låg molekylära PAH) och i grundvattnet till i medeltal ca 29 000 µg/l. När saneringen avslutades, uppmättes en medelhalt av PAH i jord på ca 7 000 mg/kg TS (600-16 000 mg/kg TS inom det mest förorenade området) och i grundvattnet mindre än 500 µg/l. Fenolhalten ökade markant i grundvattnet under det första året, men minskade därefter. Projektet ansågs inte resultatmässigt lyckat. Driftstörningar ansågs ha påverkat den effektiva behandlingstiden *in situ*.

Vad gäller väteperoxid bör halten understiga ca 300 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/liter, eftersom högre halter kan inverka toxiskt på mikroorganismerna, speciellt halter över 500 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/l. I vissa fall har till och med 100-200 mg/l visat mikrobiell toxicitet (*Alexander, 1994*). För att eventuellt minska toxiska reaktioner kan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> initialt tillsättas i låga koncentrationer < 50 mg/l med efterföljande stegvisa ökning (*Thomas och Ward, 1991*).

Exempel på att tillsats av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ibland kan ge dålig nedbrytningseffekt ges av *Hinchee m. fl. (1991)*. Man visade att vid tillsats av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i överskott *in situ*, dvs över vad som krävdes för att grundvattnet skulle bli mättat med syre, utnyttjades inte överskottet för att biologiskt bryta ned föroreningen. Man fann att H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sönderdelades mycket snabbt. Inget H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detekterades 0,2-1,4 meter nedströms från något av injektionsrören, då ca 300 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tillsattes. Inte heller chocktillsats av 5 000 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gav något märkbart mikrobiellt syreutnyttjande eller ökning av mikrobiellt tillgängligt syre. Man fann viktiga och starka indikationer på att enzym i marken (katalas) hade stor inverkan på nedbrytningen av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Detta naturligt befintliga enzym hade så stor effektivitet att det hann bryta ned H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> innan dess syre nått ut till mikroorganismerna. Författarna beskriver ett flertal ämnen (bl a citrat) som kan inhibera katalas aktivitet och därigenom även motverka katalytisk nedbrytning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Även järnoxider i marken kan katalytiskt sönderdela H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I sådana fall kan ortofosfat vara lämplig fosfor/gödningskälla, eftersom ortofosfat bildar fällning med järn som därigenom inaktiveras. Naturligt bundet järn, t ex i humus, katalyserar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i mindre utsträckning än järn löst i vatten. Ett sätt att motverka generell katalytisk sönderdelning kan vara att använda syre i form av natriumperkarbonat inkapslat i etylcellulosa (*Davis-Hoover m. fl., 1991*).

Ozon har tillsatts till bl a PAH förorenat grundvatten så att super-syremättat grundvatten (>25 ppm) genererades, sk ozon-sparging. Avsikten var främst att oxidera bl a PAH i denna zon och göra dem mer lösliga ut i grundvattnet som därefter skulle kunna pumpas upp och slutsaneras ovan jord. En annan orsak var att eventuellt underlätta aerob biologisk nedbrytning av PAHerna *in situ*. Efter ca 5 månader hade PAH halterna reducerats med ca 2/3-delar, från att ursprungligen varit ca 1,5-3 ppm total PAH i grundvattnet (*Nelson m. fl., 1997*). För att underlätta förståelsen hur nedbrytning med ozon går till har *Zeng m. fl. (2000)* gett förslag till reaktionsvägar för ben(a)pyren.

*Leahy m. fl. (1997)* testade i laboratorieskala tillsats av ozon *in situ* efter att ett PAH-förorenat område initialt genomgått biologisk behandling *in situ* (bioventing/biosparging). Avsikten var att attackera de kvarvarande tyngre PAHerna så att dessa blev oxiderade/lösliga/behandlingsbara. Testet visade att sådan kombinerad bio- och ozonbehandling kan ha hög potential att sanera PAH-förorenade områden *in situ* (då främst i grundvattnet).

I övrigt, och som nämns nedan (kapitel 6.3.3, efter figur 6.3.1), är det viktigt vid användandet av biologiska metoder på PAH-förorenat område att klarlägga om området har potential för aerob metabolism eller om området till betydande del baseras på co-metaboliska processer. Föreligger det senare krävs tester för att avgöra vilka ämnen som är lämplade att injicera *in situ* för stimulering av PAH nedbrytning. I båda fallen är det viktigt att klarlägga hur dessa mikroorganismer i övrigt stimuleras. Därtill är det inte minst betydelsefullt att klarlägga möjligheterna att utnyttja eventuella platspecifika, mikrobiellt producerade, ytaktiva ämnen och/eller de mikroorganismer som producerar dessa ämnen och/eller skumbildande mikroorganismer, alternativt testa andra ej platspecifika ytaktiva ämnen/skum (se t ex kort sammanfattning av *Wilson och Betts, 1997*). Sådana ytaktiva ämnen produceras av vissa mikroorganismer för att kunna komma åt svårlösliga PAHer (se t ex kapitel 6.3.4 nedan och referenser däri).

### 5.3. Sanering av klorerade alifater

De flesta av nedanstående exempel kan kopplas till någon av de tre saneringsmetoderna 1/injektion och extraktion, 2/ luft- eller biosparging och 3/ biologisk reaktiv barriär. Information innefattar främst erfarenheter som nyligen erhållits och som kan ligga till grund för förbättrad förståelse och design av fullskaleutföranden. Först beskrivs några aeroba saneringsutföranden *in situ*, följt av anaeroba dito. Därefter beskrivs några resultat av naturlig självrening och slutligen erfarenheter av kem-fysikaliska *in situ* metoder med avsikt att främst kombineras med biologiska metoder. För att underlätta förståelsen av detta kapitel rekommenderas att kapitel 6.4 först studeras. Bl a är det viktigt att förstå vilka klorerade alifater som kan brytas ned aerobt och vilka som först måste behandlas anaerobt och hur nedbrytningen kan ske.

#### 5.3.1. Aeroba förhållanden

Vid sanering med biologiska metoder utförs nedbrytning av organiska ämnen i de allra flesta fall med enzymer. Produktion av dessa enzymer sker i mikroorganismens cell, ofta efter att cellen på något sätt blivit stimulerad att utföra denna produktion. Ofta är det föroreningen själv eller strukturellt likartade ämnen det/de ämne/-n som utför stimuleringen. Vid aerob nedbrytning av klorerade alifater kan dock ofta denna stimulering inte aktiveras av det klorerade kolvävet självt utan istället måste en kolkälla tillsättas som kan utföra stimuleringen. Nedbrytningen av det klorerade kolvävet sker då i konkurrens med den tillsatta kolkällan av bl a icke-specifika enzym (enzym som kan bryta ned flera olika molekyler). Detta är en form av främst aerob co-metabolism (bör teoretiskt i vissa fall även gälla för anaerob co-metabolism). Eftersom mikroorganismerna hellre vill konsumera kolkällan (den kan användas för energilagring och celltillväxt vilket inte det klorerade kolvävet kan för dessa co-metaboliserande bakterier) än det klorerade kolvävet, genererar detta avancerade vetenskapliga och ingenjörsmässiga saneringslösningar.

Under en fältstudie undersöktes aerob biologisk nedbrytning av TCE (trikloretylen) i grundvatten med hjälp av bakterien *P. cepacia* G4 (Nelson *m. fl.*, 1990). Denna bakteries produktion av TCE-nedbrytande enzym visade sig kunna stimuleras genom tillsats av bl a tryptofan (US patent) (Nelson och Bourquin, 1990). Produktionen av enzymet stimulerades alltså av ett annat ämne (sk inducering, vilket även kallas co-metabolism då båda ämnena bryts ned). Efter 20 dagar erhöles 97 % reduktion av TCE. Kort därefter fann man att samma typ av bakterie (G4), även kunde utföra TCE-nedbrytning genom tillsats av ett annat induceringsämne (patentsökt av bl a samme Nelson) (Litchfield, 1993). Erhållna kunskaper används/har använts vid fullskalesanering i Japan (Moore, 1993).

En grupp från Stanford University, USA, visade under 80-talet att TCE, *cis*-DCE (dikloreten), *trans*-DCE och VC (vinylklorid) kan brytas ned under *in situ*-liknande former med hjälp av naturligt befintliga metanotrofa och heterotrofa bakteriestammar under tillsats av bl a metan (Roberts *m. fl.*, 1989). Man fann en snabb nedbrytning (halveringstid från en halv dag till några få dagar) av ovanstående ämnen till ofarliga slutprodukter. Undantaget var den erhållna toxiska intermediären *trans*-1,2-dikloroxiran, dvs en epoxid av *trans*-DCE. Denna mellanprodukt visade sig sedermera kunna brytas ned, med en halveringstid av ca 4 dagar vid 18 °C, via hydrolys.

Enligt *In Situ Bioremediation* (1993), som refererar till liknande försök, tillsattes ovanstående typer av klorerade kolväten *in situ* till en oförorenad jord, under ytterst kontrollerade former. Resultatet visade att befintliga bakterier i marken kunde bryta ned dessa föroreningar, under för-

utsättning att förhållandena optimerades. Man erhöll, under försökets tidsram, följande reduktion av tillsatta ämnen: 95 % VC, 85 % *trans*-DCE, 40 % *cis*-DCE och 20 % TCE.

*Broholm m. fl. (1991)* undersökte laboratoriemässigt biologisk nedbrytning av TCE, PCE (perkloreten) och 1,1,1-TCA (trikloreten) var för sig, i icke kontaminerad jord tagen från omätad zon. Metan-oxiderande bakterier användes och metan tillsattes. Undersökningsförhållandena designades så att de efterliknade *in situ* sanering. I avsikt att stimulera produktion av lämpliga metan-oxiderande bakterier i jorden, acklimatiserades initialt naturligt befintliga bakteriestammar, från den ursprungligen rena jorden, under en månad med metan. Därefter tillsattes klorerade alifater, tillsammans med periodvis tillsats av metan. Resultat av försöken visade biologisk nedbrytning av TCE och 1,1,1-TCA, medan ingen nedbrytning av PCE erhöles (detta är helt normalt eftersom PCE är nedbrytbart under anaeroba förhållanden). Man fann även indikationer på att 190 mg TCA/kg våt jord, respektive 25 mg TCE/kg våt jord kunde vara toxiska för metan-oxiderande biomassa.

Som nämnts ovan har, genom tillsats av metan, stimulering av produktionen av metan-oxiderande enzym för nedbrytning av klorerade alifater, varit framgångsrik (metan kan alltså stimulera produktion av enzym i bakterierna som kan bryta ned de klorerade kolvätena). På detta sätt har nedbrytning av till exempel de klorerade alifaterna TCE, TCA, DCE och VC genomförts. Motsvarande nedbrytning av PCE tycks dock vara mycket svår. I de fall området är förorenat med PCE är i princip det enda sättet att initialt biologiskt bryta ned detta ämne anaerob deklorering. Enligt *Dacyk och Hughes (1999)* skall nyligen gjorda undersökningar i fullskala emellertid ha indikerat motsatsen. Fältundersökningar gjorda i luftat klorerade kolväte- och BTEX-förorenat grundvatten under och nedströms en tvättinrättning i sydvästra Ohio, USA, gav vissa indikationer på att PCE kan ha brutits ned aerobt via samtidig nedbrytning av BTEX. Hur sådan ovanlig nedbrytning skulle ha kunnat ske förklaras ej (hypotetiskt förelåg eventuellt anaeroba delområden; som nämnts ovan anses PCE vara mycket svårnedbrytbart under rent aeroba förhållanden).

Samma författare visade att när föroreningskällan BTEX avlägsnades kunde nedbrytningen fortsätta (endast initiala resultat tillgängliga) genom tillsats/pulsering av propan och luft till det förorenade grundvattnet (även propan kan alltså stimulera aerob nedbrytning av klorerade kolväten). Intressant nog har även andra funnit att PCE-halten reducerats vid aerob sanering av klorerade kolväteförorenade grundvatten. Man menar då att PCE nedbrytning kan ske i signifikant omfattning i närheten av metanotrof aktivitet (*Grindstaff, 1998*). Metanotrof aktivitet är aerob och utförs av mikroorganismer som utnyttjar metan som kol- och energikälla med hjälp av enzymer av bl a typen metan monoxxygenas (anm: vad de menar med "i närheten av" framgår inte. Frågan kvarstår om nedbrytningen är rent aerob eller om det i närheten av metanotrof aktivitet kan finnas mikroaeroba eller anaeroba förhållanden där PCE kan brytas ned. Det borde ju vara normalt att metanotrofer lever just i gränslandet till anaeroba förhållanden eftersom det är där som metan kan produceras anaerobt).

Normalt kan högklorerade alifater mineraliseras genom att anaeroba mikroorganismer först avklorerar det klorerade kolvätet till kolväte med mindre klor. Därefter kan aeroba mikroorganismer ta vid och mineralisera det lågklorerade kolvätet till koldioxid, vatten och saltsyra (information om detta, se avsnitt 6.4.3). Även om ett område har genomgått deklorering till lågklorerade kolväten kan dock en efterföljande aerob attack visa sig vara bekymmersfull. Som exempel kan nämnas ett pågående *in situ* försök i Danmark. I ett grundvattenmagasin under ett lokstall i Köpenhamn, förorenat med VC (ca 0,3 mg/l) och *cis*-1,2-DCE (ca 0,15 mg/l) pågår undersökning avseende aerob nedbrytning av dessa föroreningar (*Ludvigsen m. fl., 1999*). Man antar att ämne-

na bildats genom anaerob nedbrytning av tidigare tillförda högre klorerade alifater. Initiala laboriestudier visade att skiftning av de anaeroba förhållandena till aeroba och med tillsats av kolkälla (metan) genererade potential att VC skulle kunna brytas ned till 100% inom 84 dagar och *cis*-1,2-DCE till 90% inom ca 200 dagar.

Man övergick därför till försökssanering i fullskala, vilket för närvarande pågår. Initialt pulserades luft (1 minut/240 minuter) innehållande 2% metan i brunnar ned till grundvattnet ca 6 m u my med 20 m<sup>3</sup>/h (kan jämföras med Dacyk och Hughes 1999, ovan, som tillsatte rent propan under några minuter/sex timmar; propaninjektionen efterföljdes av 100:1 luft/propan injektion under tre timmar i cykler). Efter att man tillfört denna luft-metan-blandning i 20 brunnar i ca 5 månader har en första utvärdering utförts. Man har nu funnit att tillförseln av syre (luft) varit otillfredsställande låg för generering av aeroba förhållanden. Man lyckades aldrig nå över 1 mg O<sub>2</sub>/l grundvatten. En betydligt ökad syretillförsel har nu startats (härmed finns tyvärr även ökade teoretiska möjligheter att klorerade kolväten kan avgå i gasfas) för att försöka generera aeroba förhållanden med förhoppning att den aeroba nedbrytningen härav skall starta (eventuellt skulle det istället vara mer lämpligt att minska medelavståndet, nu 20 m, mellan grundvattenbrunnarna, minska tillsatt mängd kolkälla för att eventuellt reducera antalet kolkälle-konkurrerare och ändra pulsfrekvensen; slutligen alltför hög syrehalt kan faktiskt ha potential att motverka nedbrytningen om metanotrofer är tänkta stimuleras, se kapitel 6.4.3.2).

Som ytterligare exempel på pulsering kan nämnas sanering utförd av *Goltz m. fl. (1997)*. Man visade i fullskala att TCE-förorenat grundvatten (0,5 mg/l) kan aerobt saneras till minst 85% under 4 månader med tillskott av toluen (8-13 mg/l) och syre i pulser (även toluen kan alltså ha viss potential att stimulera aerob nedbrytning av klorerade kolväten).

Även bl a fenol har i vissa fall visat sig stimulera nedbrytning av klorerade kolväten. Vid tillsats av miljömässigt problematiska ämnen som toluen och fenol för sådan stimulering är det dock av yttersta vikt att ha kontroll på att dessa snabbt bryts ned *in situ* innan de nått någon längre sträcka. *Hopkins och McCarty (1995)* tillsatte ca 10 mg/l toluen och fenol plus syre och väteperoxid *in situ* till ett TCE förorenat område. Indikationer fanns att bakterier med samma nedbrytningsenzym som i bakterien *P. cepacia* G4 (se ovan) fanns i aktivt tillstånd i området. Inom en testzon på 4 m, motsvarande en grundvatten-transporttid av 2 dagar, erhöles en nedbrytning på över 90 % av bl a initialt 250 µg/l TCE i grundvattnet. Fenol och toluen reducerades samtidigt till under 1 µg/l. Genom tillsats av spårämne kunde man fastslå att reduktionerna inte berodde på utspädning. Emellertid fann man att tillsats/närvaro av 1,1-DCE hade viss negativ inverkan på den aeroba nedbrytningen av TCE.

Ytterligare exempel på lyckade aeroba fullskalesaneringar med tillsats av toluen kan erhållas i *Grindstaff (1998)*. I nämnda referens kan även erhållas information avseende kostnader för sådan utförd sanering *in situ*.

Kombinering av *in situ* behandling inklusive recirkulering med behandling av recirkulerat vatten i en on-site reaktor har enligt *Xing och Raetz (1999)* givit lyckade resultat för behandling av TCE-förorenat grundvatten. *In situ* air sparging, trycksatt fluidiserad bäddreaktor med pulstillstätt kolkälla (fenol) och pump and treat (air stripping) integrerades. Med en medelhalt av TCE av 15 mg/l (max 50 mg/l; min 0,7 mg/l) erhöles en reduktion av TCE med 0,89 kg TCE/m<sup>3</sup>/dygn. Behandlat vatten i reaktorn återcirkulerades *in situ* i 15 brunnar. Efter femton månader hade 131 kg löst TCE brutits ned.



Som nämnts ovan kan co-metabolisk nedbrytning av klorerade alifater radikalt förbättras genom pulsering av tillsatt kolkälla. Tekniken bygger på att när tillsats av kolkälla avstannar finns fortfarande enzym tillgängliga (dock under en relativt kort tid) som istället attackerar det klorerade kolvävet utan konkurrens med kolkällan (halten av kolkälla är då tillräckligt låg eftersom tillförseln avstannat). Nedbrytning kan till del även ske då kolkälla finns närvarande och utmaningen för erhållande av optimal nedbrytning av klorerade kolvävet ligger bl a i avvägning av lämplig kolkällekoncentration och lämpligt tidsintervall för varje puls och cykel. Produktionen av enzym som co-metaboliskt bryter ned det klorerade kolvävet sker för olika bakterier i skilda faser under bakteriens tillväxtcykel. För optimalt utnyttjande av co-metaboliska effekter bör initial studie avseende när i tillväxtcykeln som den co-metaboliska effekten är som störst, varvid bättre förståelse för hur den mest lämpade födotillsats puls/cykel skall designas för det specifika förorenade området (mer info avseende det sistnämnda kan erhållas i *Swadley m. fl., 1999*).

Svampen *Phanerochaete chrysosporium* (vittrötesvamp) är känd för att kunna bryta ned olika typer av organiska föroreningar på samma sätt som den bryter ned lignin. Peroxidaser, dvs enzymer som genererar peroxider, utsöndras extracellulärt (utanför cellen) tillsammans med andra för nedbrytningsprocessen nödvändiga ämnen. Dessa genererar tillsammans fria radikaler med vilka till exempel högklorerade kolväten kan oxideras. Som exempel kan nämnas undersökningar utförda av *Khindaria m. fl. (1995)*. Man visade att svampen reducerade 20% av en 10 ppm lösning av TCE och ca 20% av 10 ppm CT under 9 dagar.

Det bör nämnas att det i vissa fall erhållits indikationer på att delar av molekylstrukturen hos föroreningar som "brutits ned" genom denna typ av reaktionssätt istället kemiskt inkorporerats i naturligt material, t ex humus. I de fall en molekyl innehar en fri radikal (oparad elektron) är den ytterst reaktionsbenägen och kan reagera med nästan vad som helst i sin närliggande omgivning. I de fall sådan reaktion sker med humus binds molekylerna in kemiskt och hela eller delar av föroreningen kan härav undgå detektering. Sådana indikationer har erhållits när den ursprungliga föroreningsmolekylen märkts med radioaktiv isotop. Det skall nämnas att svampen har alternativt angreppssätt för nedbrytning av organiska föroreningar, vid vilken nedbrytningen sker i svampens mycel. Detta angreppssätt anses inte inbegripa inkorporering i t ex humus. Även om det inte har gått att finna rapporter om inkorporering av just klorerade alifater (rapporter avseende detta för bl a pentaklorfenoler och TNT, se t ex *Dec och Bollag, 1994; Kaplan och Kaplan, 1982*), bör denna teoretiska möjlighet inte uteslutas.

Peroxidasproduktionen (eg lignin-peroxidase eller ligninas) är optimal främst då svampen har kvävebrist, men även produktion vid brist på svavel och kol finns rapporterat. Nedbrytning av lignin ingår som en sekundär metabolisk reaktion, vilket innebär att primärt lättnedbrytbart ämne, exempelvis glukos (i mycket små koncentrationer, millimolar) eller cellulosa, måste vara närvarande för att väteperoxid skall kunna bildas av glukosoxidas enzym (*Carberry, 1994*). Grundidén att med hjälp av väteperoxid oxidera klorerade kolväten har även använts i rent kemiska saneringsutföranden, se t ex om "Fentons reagens", nedan.

Aerob nedbrytningsstrategi kan vara svår att optimera *in situ*, p g a bl a konkurrens - inhibition mellan substrat och förorening och betydande genererade halter av reducerade ämnen (t ex  $Fe^{2+}$ , sulfider, ammoniak, etc). Därtill kan optimeringen vara svår p g a svårigheter att upprätthålla god tillförsel av lösligt substrat och syre. Det senare innebär att området inte får ha för lågt K-värde och att potential inte föreligger för att stora biomassor genereras som täpper igen transportvägar ("biofouling"). Vidare måste god optimering även kunna klara av att ta omhand klorerade kolväten i gasfas ovan jord om potential för förångning föreligger (främst då föroreningarna ligger ytligt, samtidigt som syre/luft pumpas ned *in situ*). Bland de viktigaste optimeringsfaktorer-

na är upprätthållandet av rätt syrehalt *in situ*, vilket ofta genererar relativt höga kostnader. I de fall problemen med aerob sanering kan minimeras och då inte hög-klorerade alifater föreligger (framför allt PCE) bör aerob nedbrytning övervägas som primäralternativ eftersom detta ofta kan gå betydligt snabbare än anaerob deklorering och därtill möjliggör fullständig mineralisering. Om problemen inte går att minimera bör man överväga/undersöka om istället anaerob bionedbrytning är lämplig att realiseras initialt för varje enskilt område, framför allt då området innehar betydande andel relativt högklorerade alifater (val får baseras på resultat från initiala laboratoriestudier).

Uppodling av bakterier specialanpassade för det förorenade området och för *in situ*-nedbrytning av befintlig klorerad kolväteförorening kallas för bioaugmentation. Metoden har testats med varierande resultat. Erfarenheter från nyligen genomförda tester kan troligtvis ge ökad förståelse för vilka hinder som måste undvikas för lyckade resultat. Det är allmänt känt att tillsats av bakterier *in situ* kan resultera i igentäppning av rören (biofouling) och området strax intill rören där bakterierna (och ev. näringsämnen) förs ut *in situ* (normalt i grundvattenzonen). Igentäppningen består i allmänhet av biokolloider (ca 1 $\mu$ m), som i sin tur kan bestå av både bakterier, bakteriekolonier och/eller bakterieprodukter som lätt fäster sig på jordpartiklar i grundvattenzonen. Detta kan resultera i att transport av dessa oftast inte når mer än 1 meter från röret. *MacDonald m. fl. (1999a)* och *MacDonald m. fl. (1999b)* har tagit fram en preliminär modell för recirkulations-system *in situ* som förutser vilka fysikaliska förhållanden som bör föreligga för att minska biofouling. Modellen behöver förfinas genom ytterligare *in situ* tester, men kan i sin nuvarande förenklade version ändå öka förståelsen för orsakerna till problemet.

Vad gäller bioaugmentation och biofouling bör man ta hänsyn till att vissa bakterier har egna transportmotorer som, enligt *Logan m. fl. (1997)* (som refererar till *Mercer m. fl., 1993*), normalt resulterar i en förflyttningshastighet av ca 3,5 m/dag. Denna angivna bakteriella egen-transporthastighet tycks dock vara tämligen hög (rimligt värde?, sammanlagd sträcka i xyz-led?). Nämnade förflyttningshastighet kan jämföras med *Witt m. fl. (1999)* som refererar till olika rapporter. De anger att bakterier befunnits ha porhastigheter upp till 0,3 m/dag. I vilket fall, flödes-hastigheter hos det tillsatta bakterievattnet som resulterar i en transporthastighet av bakterierna som markant överstiger bakteriernas egengenererade förflyttningshastighet, ökar radikalt möjligheten för att bakterierna fastnar i porer och små sprickor, resulterande i igensättning.

För att nå tillräckligt bra spridning *in situ* av tillsatta bakterier vid en fullskalesanering måste dessa ofta behöva transporteras tiotals meter från varje rör. *Logan m. fl. (1997)* fann att främst låg jonstyrka (~0,01 mM), låg tillsatshastighet av bakterierna (dvs låg tillsatshastighet av bakterievattnet) motsvarande ca 1 m/dag och närvaro av hydrofoba kolväten (non-aqueous phase liquids, NAPL) i deras fall i form av PCE, ökade spridningsradien av bakterier kring rören. Man antog att låg jonstyrka upprätthöll repulsion mellan negativt laddade jordpartiklar och negativt laddade cellytor. I allmänhet anses att då NAPL föreligger, ökas bakteriernas egentransport. Man ansåg att detta hypotetiskt till del berodde på att NAPL, i det här fallet PCE, hade täppt igen de små porerna i vilka bakterierna annars skulle bli fångade. En annan förklaring skulle kunna vara att det förelåg metaboliskt nedbrytbar kolkälla i omgivningarna. I sådana fall tenderar vissa bakterier, enligt *Witt m. fl. (1999)*, att öka sin mobilitet till det förorenade (födo-) området.

### 5.3.2. Anaeroba förhållanden

Anaerob nedbrytning av klorerade alifater resulterar enbart i att molekylen klor byts ut mot väte, sk deklorering. Högklorerade alifater överförs härigenom till lågklorerade alifater. För att

detta skall kunna ske krävs tillgång till bl a vätedonator och elektronondonator (förenklat sett kan ett och samma ämne ibland donera både vätejoner och elektroner, ibland samspelar nedbrytning/förändring av olika ämnen resulterande i sådana donationer), anaeroba förhållanden och anaeroba mikroorganismer som kan utföra detta byte. Ju mindre antal klor som kolvätet innehar, desto långsammare går processen. För klorerade alifater kan reaktionerna i relativt sällsynta fall gå så långt att slutprodukten blir rent kolväte (dvs innehållande inga klor utan bara kol och väte). Lågklorerade alifater, som bildats vid den mikrobiella anaeroba dekloreringen av högklorerade alifater, kan därefter mikrobiellt mineraliseras om ett skifte i redox-förhållandena sker till mer aeroba förhållanden. Detta avsnitt tar upp anaerob deklorering.

För bästa förståelse av nedanstående information rekommenderas att kapitel 6.4.3.1 först inhämtas. De vätekällor/elektronondonatorer som normalt brukar användas är bl a vätgas, propionat, butyrat, etanol, laktat och metanol. Med undantag för tillsats av ren vätgas genereras vätgas vid anaerob nedbrytning av dessa ämnen av normalt förekommande mikroorganismer *in situ*. Väte/elektronondonator-källan kan antingen tillsättas eller tillåtas produceras av mikroorganismer på plats. Denna mikrobiella produktion av väte kan gå olika snabbt och synes vara både plats- och ämnesspecifikt. Enligt *Becvar m. fl. (1997)* visade undersökningar gjorda vid Cornell, USA, att i deras fall genererades vätgas mycket snabbare via tillsats av och nedbrytning av etanol, i förhållande till tillsatt laktat, butyrat, propionat eller benzoat. Vad som genererar väte snabbast är troligtvis det som är termodynamiskt fördelaktigast under de platsspecifika förhållandena. Man fann emellertid att snabb vätegenerering inte generellt var bäst. Optimalt genomförande av anaerob strategi bör bl a härav föregås av laboratoriestudier, bl a för att finna platsspecifik optimal elektron-/väte-källa.

Istället för att tillsätta kolkälla, som av mikroorganismer *in situ* skall omvandlas bl a till vätgas, skulle man kunna tillsätta ren vätgas *in situ* (eftersom vätgas är explosivt måste dock detta förknippas med stränga säkerhetsföreskrifter). *Fisher m fl. (1998)* har nyligen startat ett projekt där detta skall testas.

Snabb vätegenerering och härav generering av höga vätgashalter synes alltså inte vara fördelaktigt vid anaerob sanering av klorerade alifater. *Fennell och Gossett (1999)* har givit orsaksscenario till varför vätekoncentrationen, och till den kopplad typ av vätedonator, är av betydelse vid anaerob nedbrytning av klorerade alifater. Man anser att:

scenario 1/ klorerat kolväte(här PCE)-halt < 50 ppm (> 50 ppm ansågs i deras fall hämma de mikroorganismer som inte kan bryta ned klorerade kolväten men som ändå kräver väte i sina processer; sk vätekonkurrenter) och överskottsproduktion av väte (mer än en tiopotens högre än det stökiometriska behovet för nedbrytning av angiven PCE-halt) ger mer än tillräckligt för vätekonkurrenterna (dvs de metanogener som inriktat sig på att, istället för att attackera det klorerade kolvätet, producerar metan från väte och koldioxid). Härav blir en liten överskottsdel av vätet tillgängligt för deklorerarna (dvs de mikroorganismer som byter ut klore mot väte på det klorerade kolvätet), resulterande i låg nedbrytningshastighet av PCE (dock ändå större än noll);

scenario 2/ PCE >50 ppm gör att låg koncentration av väte räcker eftersom halten PCE hämmar vätekonkurrenterna. Härav erhålls hög nedbrytningshastighet;

scenario 3/ signifikant men icke-hämmande halt av PCE (< 50 ppm) och därtill väte i stökiometrisk proportion (dvs ej i överskott) resulterar i att vätekonkurrenterna förbrukar så mycket väte att otillräcklig vätehalt finns tillgängligt för deklorerarna, resulterande i att ingen PCE nedbrytning sker. Om vätehalten här sänks radikalt kommer deklorerarna däremot att ta över efter-

som dessa kan utföra deklorering vid betydligt lägre vätekoncentration än vid minsta nödvändiga vätekoncentration hos konkurrenterna.

Kontentan av dessa scenario blir, för optimal nedbrytning av PCE, att hög koncentration av PCE kräver relativt låg koncentration av väte, låg koncentration av PCE kräver mycket hög, eller alternativt mycket låg, vätekoncentration (delvis i linje med beskrivna erfarenheter av *Becvar m. fl. (1997)* ovan; de ansåg att producerad vätgashalt var hög men var enligt ovanstående scenario alltså i så fall inte tillräckligt hög).

Sätts ovanstående resonemang i relation till det i fullskala ofta uppkomna problemet "biofouling", dvs igentäppning av rör *in situ* i vilka bl a nedbrytningsstimulerande ämnen tillsätts, blir rätt kombination än mer ingenjörsmässigt betydelsefullt. Biofouling kan uppkomma både under aeroba och anaeroba förhållanden. Under anaeroba dito kan detta uppkomma vid tillsats av väte-/elektron-donator. Olika sådana ämnen/donatorer kan ge olika snabb mikrobiell celltillväxt. Därtill transporteras olika sådana ämnen olika smidigt *in situ* (löslighet, sorptionsbenägenhet etc). Sist men inte minst måste hänsyn även tas till deras varierande miljövänlighet vid injektering *in situ*. *Carr och Hughes (1999)* anser att ämnena butyrat, etanol, laktat och metanol genererar mer biomassa (och därmed ökad benägenhet till biofouling) per genererad vätemolekyl, jämfört med propionat och vätgas. *Fennell och Gossett (1999)* anser att vätgas och etanol kan konsumeras alltför snabbt vid injektionspunkten så att deras spridning *in situ* försvåras. Härav framgår att val av vätedonator sannolikt är platsspecifikt. Exempel på lyckade anaeroba fullskalesaneringar med tillsats av bl a metanol och laktat kan erhållas i *Grindstaff (1998)*.

I övrigt, vid anaerob nedbrytning i fullskala har det alternativa ämnet glycerol-polylaktat tillsatts som elektron-/vätekälla i grundvatten vid en tvättinrättning i USA. Tillsatsen gjordes för att påskynda anaerob nedbrytning *in situ* av PCE. Under de första 70 dagarna ökade nedbrytningshastigheten med ca 11,5 ggr, jämfört med ett intilliggande referensområde. Totalt reducerades mängden PCE med 80% under 253 dagar (*Sheldon m. fl., 1999*).

Liknande ämne (polylaktatester) används för närvarande av *Koenigsberg och Farone (1999)* i en fältstudie för anaerob nedbrytning av klorerade kolväten. I ett enkelbrunn-test erhöles efter 3 månader mellan 96-99% reduktion av TCE (initialt ca 1,4 mg/l), cis-1,2-DCE och VC. Parallellt, i ett flerbrunn-test erhöles efter ca 8 månader en ca 80%-ig reduktion av PCE, med initial ökning av nedbrytningsprodukterna TCE och DCE.

### 5.3.3. Anaerob-aerob kombination

Förbehandling med aktiva anaeroba metoder för sanering av klorerade kolväten brukar främst ske då föroreningen består av PCE. Efter att man genererat fullständigt anaeroba förhållanden *in situ*, tillsatt lämpliga ämnen och låtit reaktionerna gå tillräckligt lång tid för att dekloreringen ska ha skett i tillfredsställande grad, tillförs någon form av syre *in situ*. Utföranden i kapitel 5.3.2 kopplas alltså till 5.3.1.

Alternativet till aktiva metoder kan ibland vara naturlig självrening. Metoden, som allmänt beskrivs i kapitel 4.4, har fått ett stort intresse under senare tid för sanering av just klorerade kolväten. Vid naturlig självrening pågår både aeroba och anaeroba processer. De klorerade alifatförorenade grundvatten som kan komma ifråga för naturlig självrening kan delas in i tre huvudtyper:

Typ 1 innefattar områden där antropogena kolkällor (t ex petroleumprodukter och deras temporära nedbrytningsprodukter, sk intermediärer) finns närvarande och kan utnyttjas av plats specifika mikroorganismer som primär kolkälla och som generator av elektroner/väte till dekloreringen. Sådana områden tenderar att vara anaeroba och reduktiv deklorering av högklorerade kolväten kan vara ganska snabb.

Typ 2 är områden innehållande tillräckligt med naturligt organiskt material för upprätthållandet av anaerob omgivning och för produktion av elektroner/väte och biomassa. Nedbrytnings hastigheten är här beroende av bl a mängden tillgängligt nedbrytbart naturligt organiskt material, bl a för generering av vätgas (och därmed elektroner). Konstant genererad vätgashalt behöver dock inte vara hög; som nämnts ovan kan anaerob nedbrytning av klorerade kolväten ha fördel av om halten genererat väte är relativt låg, vilket inte sällan är fallet vid naturlig självrening av klorerade kolväten (som nämns ovan bör den klorerade kolvätehalten då vara relativt hög).

Typ 3-områden innehar låg halt av både antropogena och naturliga kolkällor och är inte lika starkt anaeroba som Typ 1 – 2 områden. Reduktiv deklorering av högklorerade kolväten förekommer inte här, men området kan uppvisa oxidation av bl a vinylklorid och dikloreten. Även om dessa tre typer kan verka oberoende av varandra kan de ändå existera på olika platser inom ett och samma förorenat område (*Moutoux m. fl., 1997*).

*Mahaffey m. fl. (1999)* har utfört en utvärdering avseende potential för naturlig självrening och aktiv sanering av TCE, 1,1,1-TCA, 1,1,2-TCA och DCM (diklormetan) i grundvattnet under och nedströms ett statligt laboratorium i Denver, Colorado. Förutom dessa klorerade alifater var grundvattnet även förorenat med antropogena organiska ämnen (petroleumprodukter och deras intermediärer). Härav fanns lämpliga cosubstrat/elektron donatorer för nedbrytning av de klorerade kolvätena. 28 grundvattenbrunnar i föroreningsplymen provtogs (med bladderpumpar) avseende parametrar indikativa för naturlig nedbrytningsaktivitet. Parallellt utfördes laboratoriestudie på två grundvattenprov för att undersöka befintlig aerob/anaerob nedbrytningspotential. Både laboratorie- och fälttesterna gav goda indikationer på pågående aerob/anaerob nedbrytningsaktivitet m a p bl a de klorerade kolvätena och därmed naturlig självrening. Därtill erhöles indikationer på att området innehöll bakterier och övriga förhållanden som, vid en alternativ eller parallell aktiv *in situ* sanering, avsevärt skulle kunna öka nedbrytningen, bl a genom tillsats av utvald/-a kolkälla/kolkällor som metan, men även propan och fenol.

I de allra flesta fall som anaerob nedbrytning av klorerade alifater har verifierats *in situ* har man tidigare ansett sådan nedbrytning vara baserad på co-metaboliska processer. Dessa processer anses vara relativt långsamma, framför allt vid naturlig självrening ( $t_{1/2}$ , dvs halveringstid, på flera år inte ovanligt). Enligt *Hardy m. fl. (1999)* (som även refererar till *Fennell m. fl., 1997* och *McCarty, 1997*) och *Carr m. fl. (1988)* (som refererar till bl a *Holliger m. fl., 1993* och *Krumholz m. fl., 1996*) har man dock i ett flertal fall funnit att en betydligt snabbare naturlig självrening-nedbrytning av vissa klorerade kolväten *in situ* kan ske, bl a av *cis*-DCE ( $t_{1/2}$ : 3 veckor), TCE ( $t_{1/2}$ : 1 vecka-6 mån) och av 1,2-diklorpropan (1,2-DCP) ( $t_{1/2}$ : 6-8 veckor). Intressant att notera är att även PCE har befunnits kunna genomgå relativt snabb nedbrytning ( $t_{1/2}$ : 5-28 veckor). Dessa snabba förlopp anses bero på anaerob metabolisk nedbrytning av det klorerade kolvätes, sk dekloro-respiration (relativt nyupptäckt mikrobiell attack, se bl a kapitel 6.4.3.1. nedan).

Enbart naturlig självrening kan sannolikt inte komma i fråga i de flesta fall då jord och grundvatten är förorenade med mycket höga klorerade kolvätehalter. I dessa fall är sannolikt en aktiv sanering av fri produkt och hot spots i kombination med naturlig självrening av övriga intilliggande områden mer framgångsrikt. Exempel på detta ges av *Slenders m. fl. (1999)*. Jorden under en reningsindustri i Holland innehöll upp till 60 000 mg PCE/kg och upp till 10 000  $\mu\text{g}$  DCE/l i

grundvattnet. Därtill var delar av området hög-kontaminerat med andra klorerade kolväten, som DCE och VC. Den förorenade grundvattenplymen sträckte sig ca 600 m nedströms industrifastigheten. Indikationer fanns att naturlig självrening i form av främst anaerob nedbrytning förekom (höga halter nedbrytningsprodukter nedströms). Laboratoriestudier visade att området hade god mikrobiell potential att bryta ned de klorerade kolvätena. Med hjälp av modellering visades att enbart naturlig självrening skulle ta mer än 700 år innan området, inklusive dess grundvatten, skulle kunna anses rent. Om istället hotspots sanerades aktivt skulle områdets grundvatten nå acceptabla halter med hjälp av naturlig självrening redan efter ca 15-20 år. Ett flertal olika alternativa saneringstekniker har tekniskt/ekonomiskt/miljömässigt riskvärderats varvid framkommit att aktiv sanering av hot spots med efterföljande naturlig självrening är bäst för området. Planering pågår nu för igångsättande av denna fullskalesanering.

#### 5.3.4. Övriga metoder

Slutligen kan nämnas något om kem-fysikaliska metoder som är under utveckling och som är tänkta att användas i kombination med mikrobiologiska metoder, med målsättning att underlätta/förbättra/påskynda destruering av klorerade alifater. De flesta av nedanstående exempel kan kopplas till metoden "biologisk reaktiv barriär" (se kapitel 3).

I vissa fall kan järnets katalytiska förmåga att sönderdela väteperoxid ( $H_2O_2$ ) utnyttjas vid sanering. Vid denna process bildas reaktiva hydroxylradikaler som kemiskt kan oxidera klorerade kolväten, såsom TCE (trikloreten). Härigenom kan man på kemisk väg underlätta för mikroorganismerna att reducera klorinnehållet i molekylen. *Ravikumar och Gurol (1994)* har i labbskala visat att hög oxidationsgrad av organiskt bundet klor på detta sätt kan erhållas, då den klororganiska föreningen fanns i sand.

"Fentons reagens" ( $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$ ) tillsattes till klorerat kolväte-förorenat grundvatten i avsikt att generera hydroxylradikaler (*Kastner m. fl., 1999*). Målsättningen med bildandet av dessa radikaler är att de skall oxidera de klorerade kolvätena. Bildade oxiderade produkter är tänkta att lättare kunna attackeras av främst aeroba mikroorganismer. Man menar att enbart tillsats av Fentons reagens *in situ* i allmänhet inte är tillräckligt för att fullständigt mineralisera föroreningarna. För att uppnå detta måste metoden i allmänhet samspela med biologisk mineralisering. Aggressiva förhållanden (oxiderande och sura) är en av de ytterligare faktorer som krävs för att Fentons reagens skall fungera optimalt. Därmed föreligger risker att eventuellt befintliga klorerade kolvätenedbrytande mikroorganismer dör, och då också den viktigaste faktorn som visat sig behövas för att nå nödvändig saneringseffektivitet. Man fann att den pH-sänkning som metoden genererade (pH 2,4) var en av de avgörande faktorerna för otillfredsställande reduktionsgrad. Man tillsatte då kolkälla för generering av co-metabolisk nedbrytning. Tyvärr erhöles ändå inte tillfredsställande reduktionsgrad och man drog slutsatsen att bättre kunskap avseende interaktion mellan mikrobiota och Fentons reagens behövs för att metoden skall ha någon framtid som saneringsmetod för klorerade kolväten.

Det framgår inte i ovanstående sistnämnda rapport vilken koncentration av väteperoxid som förelåg i grundvattnet. Det kan nämnas att man anser att väteperoxidhalten bör understiga ca 300 mg/liter, eftersom högre halter kan inverka toxiskt på mikroorganismerna, speciellt över 500 mg/l. I vissa fall har till och med 100-200 mg/l uppvisat mikrobiell toxicitet (*Alexander, 1994*). Enligt *Pardiek m. fl. (1992)* är intracellulära  $H_2O_2$ -halter över 0,1 mM toxiska för mikroorganismerna. För att försöka minska toxiska reaktioner kan man testa att initialt tillsätta  $H_2O_2$  i låga koncentrationer < 50 mg/l med efterföljande stegvisa ökning (*Thomas och Ward, 1991*).

Som alternativ till Fentons reagens för initial oxidering av klorerade kolväten har kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) testats, både i labbskala och i *in situ* fälttest (Nelson och Barker, 1999). Till TCE förorenat vatten (4,95 mg/l) tillsattes  $\text{KMnO}_4$  (50 mg/l) i labbskala. TCE halten reducerades till under detektionsgräns inom 400 minuter (vilka nedbrytningsprodukter som genererades har ej angetts). I fält testades i pilotskala ett flertal olika injekteringsmetoder varav man fann maximal omvandling av TCE från 8,6 ppm i vatten till under detektionsgräns efter 6 dagar (även här anges inte vilka produkter som bildades, troligtvis bl a oxiderade klorerade kolväten). Resultaten gav att den mest kritiska faktorn var masstransporten *in situ* av permanganaten till föroreningen och kontrollen av denna masstransport. Fullskaleförsök pågår för närvarande.

Vid nedbrytning av klorerade kolväten kan tillsats av enbart järn eventuellt vara en möjlig metod.  $\text{Fe}(0)$  i vatten bildar vätgas ( $\text{Fe} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$ ) som i sin tur kan utnyttjas av mikroorganismer som elektronodonator vid anaeroba dekloreringsprocesser. Matheson och Tratnyek (1994) undersökte hur tillsats av finkornigt järn (100 mesh) påverkade anaerob nedbrytning av koltetraklorid (0,1-0,2 mM) via kloroform och metylenklorid. Man fann att reaktionshastigheten minskade för varje sådant reaktionssteg, från en halveringstid av ca 3 dagar för första steget till ingen signifikant nedbrytning (undersökt under en månad) för sista steget (nedbrytning av metylenkloriden). Parallellt fann man att halveringstiden för trikloretylen var ca 30-40 dagar. Man fann att en avgörande faktor för nedbrytningshastigheterna var hur rena järnmetallytorna var; rena gav lägre hastighet jämfört med rena. Ökning av pH minskade också hastigheten (det bildas hydroxylradikaler som kan ge högt pH i vattnet). Deras slutsats var att reaktionerna var beroende av hur mycket järn som kunde bringas att korrodera; ju mer desto bättre.

Lien och Zhang (1999) har undersökt möjligheterna att bryta ned klorerade metaner i vatten med partiklar (0,001-0,1  $\mu\text{m}$ ) av palladiumbelagt järn (0,05-1 v-% Pd), alternativt enbart järn (ursprungligen samma typ och storlek av järnpartiklar) som katalysatorer. Partiklarna reducerade en vattenlösning med ca 15 mg/l (0,1 mM) tetraklormetan (CT) till < 0,05  $\mu\text{g/l}$  inom en timma. En lösning med ca 14 mg/l triklormetan (CF) reducerades med mer än 98 % inom en timma. En långsammare reduktionshastighet (1/20 – 1/100) erhöles med de järnpartiklar som ej var belagda med Pd. I båda fallen var den huvudsakliga nedbrytningsprodukten diklormetan, dock genererades betydligt högre koncentration från de rena järnpartiklarna. Palladiums galvaniska effekt tillsammans med järn och den generellt goda katalyserande effekten ansågs vara orsakerna till Pd-belagt järns förbättrade nedbrytningseffektivitet.

Chiu m. fl. (1999) har i labbskala undersökt tillsättande av vitamin B12 och  $\text{Fe}(0)$  till PCE förorenat vatten, som även innehöll en blandkultur av *Methanosaeta concilii* och *Methanosaeta* sp. (vitamin B12 finns i en typ av enzym som har förmågan att bryta ned bl a klorerade alifater, se kapitel 6.4.3.1). Test visade att tillsats av B12 initialt ökade den anaeroba nedbrytningen av PCE. Tillsats av  $\text{Fe}(0)$ -pulver ökade reduktionen av klorerade intermediärer med eten som den huvudsakliga slutprodukten. Man föreslår nu att pilot- och fullskaletest utförs med  $\text{Fe}(0)$  och ev. B12 som *in situ* reaktiva barriärer.

Sammanfattningsvis kan sägas att biologiska metoder, både enbart och i kombination med kemfysiska metoder, har stor potential att kunna användas för sanering av klorerade alifater. Av betydelse för lyckad sanering är god kunskap om vilka platsspecifika förhållanden som mikroorganismerna kräver för optimal nedbrytning och mineralisering och hur dessa designas under fältmässiga förhållanden. Därtill krävs förståelse av vilka problem som kan uppkomma och hur väl dessa kan undvikas eller lösas utan att saneringseffektiviteten reduceras.

## 6. BIOGEOKEMISKA PROCESSER FÖR NEDBRYTNING AV ORGANISKA MILJÖFÖRORENINGAR

Vid biosanering används levande organismer (främst bakterier och svampar) för att omsätta olika typer av föroreningar. Varje saneringen måste anpassas efter de biologiska och kemiska fysikaliska processer som verkar eller kan bringas att verka på platsen. Ofta får man förändra saneringsinsatserna efterhand som föroreningen bryts ned och nya processer tar vid under skilda nedbrytningsstadier. För att kunna välja och anpassa insatserna på bästa sätt krävs en förståelse för hur mikroorganismer bryter ned olika typer av föroreningar. Det krävs kunskap om mikroorganismers funktion, var de finns och vilka typer av reaktioner de kan tänkas företa. Alla levande organismer måste ha energi och denna kan under vissa förhållanden hämtas från oljeprodukter och andra organiska föroreningar i marken. I naturen föreligger huvuddelen av det organiska materialet i form av polymerer. T.ex. består cellulosa av glykos i långa polymerkedjor och proteiner av byggstenarna aminosyror. För att en organism skall kunna utnyttja polymerer som kol- och energikälla måste de först spjälkas upp i mindre och för mikroorganismen upptagbara bitar. Denna process sker med hjälp av olika enzymer och är ett viktigt led i saneringen av organiska föroreningar.

Detta kapitel inleds med en beskrivning av de olika elektronacceptorer som mikroorganismer använder vid nedbrytning av organiska föroreningar. Därefter fokuseras kapitlet på organiska föroreningar som under den närmaste tiden kan anses ha störst potential att genomgå sanering i Sverige, dvs:

- Alkaner
- Monoaromater och PAH
- Klorerade alifater

### 6.1. Elektronacceptorer

Här ges en kort beskrivning av olika oorganiska elektronacceptorer (TEA, terminala elektronacceptorer) som mikroorganismer använder vid biologisk nedbrytning av kolväten. Vissa elektroner som frigörs under nedbrytningsreaktionerna kan omhändertas av olika TEA, resulterande i olika energiutnyttjande i cellen. Olika typer av elektronacceptorer utnyttjas i varierande grad vid nedbrytning av skilda föroreningar. Mer om detta under varje enskild föroreningsgrupp nedan.

Elektronacceptorerna är efter kvalité ordnade enligt; syre  $\rightarrow$  nitrat  $\rightarrow$  järn  $\rightarrow$  sulfat  $\rightarrow$  metanjäsning. Man kan även tänka sig andra elektronacceptorer som t ex mangan ( $\text{Mn}^{\text{IV}} \rightarrow \text{Mn}^{\text{II}}$ ) eller väte ( $\text{H}^{\text{I}} \rightarrow \text{H}^{\text{0}}$ ) m fl, som dock inte behandlas här. De teoretiska formlerna som visar de olika elektronacceptorens funktion vid nedbrytning av toluen tar ej hänsyn till celltillväxt.

Syre ( $\text{O}_2$ ):

Syre är kvantitativt och kvalitativt den viktigaste elektronacceptorn vid biologisk nedbrytning av organiskt material. Användandet av syre utförs under aeroba förhållanden. Användandet av övriga elektronacceptorer sker under anaeroba förhållanden.

Syret fungerar som elektronacceptor enligt formeln:



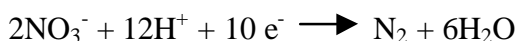


Lösligheten av syre i vatten beror på temperatur, tryck och salthalt, men ligger i storleksordningen 10 mg/l. Om man räknar med avseende på vikt, åtgår det teoretiskt ca tre gånger så mycket syre som kolväte vid den biologiska nedbrytningen (beroende på vilket kolväte som bryts ner). Lösligheten av syre i vatten är ofta den begränsande faktorn vid aerob biologisk nedbrytning. Ett sätt att tillföra syre till den biologiska nedbrytningen är att sätta till syret på kemisk väg. *Norris (1994)* fastslår att genom att använda väteperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kan man öka tillförseln av syre 5-50 ggr gentemot bubbling med luft. Man kan även använda andra kemiska preparat för att öka mängden tillgängligt syre, t ex magnesiumperoxid ( $\text{MgO}_4$ ), som föreslås av *Defibaugh and Fischman (1999)*, ozon ( $\text{O}_3$ ) (*Spanggord m. fl. 2000a*) eller en blandning av ozon och väteperoxid (*Acero m. fl. 2000, Spanggord m. fl. 2000b, Nélieu m. fl. 2000*).

Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ):

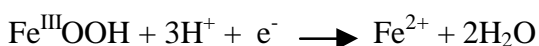
Nitrat är kvalitativt den elektronacceptor som först utnyttjas när syret har tagit slut. Lösligheten för natriumnitrat i vatten är 92 g/l, jämfört med syrets ca 10 mg/l (*Reinhard 1994*).

Nitrat fungerar som elektronacceptor enligt formeln:



Järn ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ):

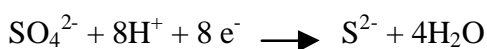
Järnreducerande bakterier finns i miljöer (eller mikromiljöer) där syre och nitrat redan är reducerat. Bakterierna kan utnyttja trevärt järn för att oxidera organiska föreningar. Det trevärda järnet fungerar som elektronacceptor enligt följande formel:



Vid förorenade aquiferer finner man ofta höga halter av tvåvärt järn (10-100 ppm) i de anaeroba delarna av systemet (*Borden 1994*), vilket tyder på en kvalitativt viktig roll för järnreducerande bakterier. Man misstänker att järnreduktionen är viktig vid nedbrytningen av kolväten främst i ej ytnära processer.

Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ):

Sulfat fungerar som elektronacceptor enligt följande formel:



Fermentation:

Metanjäsning, fermentation, är en process som tros pågå på ett flertal ställen där de geokemiska förutsättningarna har utvecklats utan inblandning från människan (*Reinhard 1994*). En allmän formel för metanjäsning kan skrivas:



Generellt är mikroorganismerna vid metanjäsning, mycket känsliga för yttre betingelser som pH, temperatur, näringsbalanser, gifter o s v, vilket gör att processen är svår att använda i många sammanhang.

Man kan även tänka sig en blandning av olika elektronacceptorer, där de olika processerna sker i mikromiljöer eller i samverkan. *Beller et al (1992)* studerade kopplingen mellan dissimilatorisk sulfatreduktion och järnreduktion i en kultur som var anrikad för sulfatreduktion. Järn<sup>III</sup> tycks

åter-oxidera vätesulfid i en abiotisk process och sänker därmed den inhibitoriska effekten av vätesulfiden. Liknande processer förekommer ofta vid nedbrytning av organiskt material i anaerob miljö, där restprodukterna ofta åter-oxideras av högre kvalitativa elektronacceptorer.

## 6.2. Alifater (*spec. alkaner och alkener*)

### 6.2.1. Inledning

Alifater, speciellt n-alkaner (raka alifatiska kolväten, se nedan), är goda indikatorer för biogena och petrogena produkter (*Zeng och Vista, 1995*). Grenade alkaner (i-alkaner) (ex. 2-metylpropan, 2,2,4-trimetylpentan) och i viss mån även cykloalkaner (ex. cyklopentan, metylcyklohexan) är (tillsammans med aromater, t ex bensen och 1,2,4-trimetylbensen) huvudkomponentgrupper i bensin, medan raka alkaner (n-alkaner) är en av huvudkomponentgrupperna i diesel (*Earth Science 80 E, 1998*).

Bensin innehåller kolväten med antal kol främst inom intervallet från C4 upp till C10 (kokpunktintervall ca 30-180 °C), medan diesel innehåller kolväten med antal kol mellan främst C13 – C20 (approximativt kokpunktsintervall 230-300 °C). De n-alkaner som då diesel främst består av ligger alltså inom intervallet C13-C20, men det finns även n-alkaner i diesel med lägre och högre antal kol. Alltså, består föroreningen av främst C13-C20 alkaner kan föroreningen vara t ex diesel men ej bensin. Om C13-C20 föreligger, men dess andel är relativt liten, kan detta vara en indikation på att föroreningen är vädrad”, dvs delvis biologiskt nedbruten. I de fall både  $\leq$  C10 och  $>$  C10 alkaner föreligger i relativt stor omfattning kan föroreningen vara en blandning av olika petroleumprodukter. Som exempel kan nämnas jetbränslen av typ flygfotogen eller JP-x (där x normalt står för 4, 5 eller 8). JP-4 har n-alkaner främst mellan C4-C14; JP-5, har n-alkaner främst mellan C10-C16; JP-8 har n-alkaner främst mellan C7-C18. Förutom n-alkaner har dessa produkter naturligtvis även andra alifater och därtill olika typer av aromater.

Fördelning av olika alkaner kan under fördelaktiga omständigheter erhållas med GC/FID kromatografi. I vissa fall kan en puckel (”hump”) uppkomma i kromatogrammet som är så signifikant att denna blockerar GC/FID topparna för alkanerna (svårigheter kan då uppkomma att identifiera alkanerna). Humpen kan bestå av många olika kolväten med mycket likartade kromatografiska egenskaper och uppträder inte alltför sällan i prov med ”vädrade” petroleumprodukter (och anses då, enl. svenskt laboratorium, till betydande del bestå av grenade alifater).

### 6.2.2. Kemisk struktur och egenskaper

Alifater kan delas in i acykliska och alicykliska alifater. Acykliska alifater delas in i (alla de tre nedanstående typerna kan bestå av raka och/eller helt/delvis grenade kolväten):

- Alkaner, som är mättade kolväten. Mättade kolväten innehar ingen dubbelbindning mellan kolatomerna, alla bindningar är enkelbindningar. Exempel på en rak alkan är n-oktan, grenad alkan är iso-oktan. Raka alkaner brukar benämnas n-alkaner och grenade ibland i-alkaner.
- Alkener, som innehar minst en dubbelbindning. Exempel på en alken är buten (en dubbelbindning, rak, två enkelbindningar) och 2,4-heptadien (två dubbelbindningar, en mellan kol 2 och kol 3 och en mellan kol 4 och kol 5, rak, i övrigt fyra enkelbindningar).
- Alkyner, som innehar minst en trippelbindning. Exempel på en alkyn är acetylen (en

trippelbindning, ingen enkel- och ingen dubbelbindning).

Alicykliska alifater innehar, till skillnad från de acykliska, någon form av ringsystem, vars bindingsstruktur är främst mättad (kan dock till mindre del innehålla omättade bindningar men inte till den grad att molekylen övergår till aromat). Exempel på alicyklisk alifat är cyklohexan (sex kolatomer i en ring bundna med mättade bindningar).

Ytterligare information om olika kolväteindelningar och strukturer kan erhållas i *Ebersson (1970)*.

Detta kapitel behandlar främst alkaner och i viss mån även alkener. Alkaner finns i råolja, varav i vissa ända upp till 90-95 % (*Chapelle, 1993*). I raffinerade produkter finns alkaner och alkener i avsevärd andel i diesel, men även i bensin, eldningsolja etc.

Lösligheten (mg/liter, ppm, mol/liter) för ett organiskt ämne definieras ofta som maximal mängd löst ämne (mättad) i rent vatten vid 25 °C och 1 atm. Lösligheten av alifatiska kolväten av storleken C5 till C18 i vatten är låg till mycket låg och sträcker sig från  $10^{-3}$  till  $10^{-8}$  mol/liter (*Schwarzenbach m. fl., 1993*). Exempelvis, isopentan har lösligheten ca  $5 \cdot 10^1$  mg/l (ca  $10^{-3}$  mol/l) medan n-oktadekan har löslighet i storleksordningen  $10^{-3}$  mg/l (ca  $10^{-8}$  mol/l) (*Verschueren; 1983*). För de allra flesta alifater, framför allt inom samma grupp, gäller trenden att ju fler kol i kolkedjan desto sämre löslighet. Jämförs lösligheten med petroleumbaserade enklare aromater (BTEX) fås att BTEX har mycket högre löslighet i vatten än alifater. I de fall en petroleumprodukt, som spills i vatten, innehar avsevärda halter av både alifater och enklare aromater är det härav normalt att framför allt är BTEX detekteras löst i vattnet.

Organiska ämnen med hög löslighet transporteras lätt med vattenströmmarna och tenderar att ha låg adsorption till jord och i vissa fall låg bioackumulering (relativt god bionedbrytbarhet). Adsorption av alifater till jord är bl a en funktion av kolvätetets fördelningskoefficient till organiskt kol (Koc), Tabell 6.2.1. Eftersom medeldensiteten för petroleumbaserade drivmedel generellt ligger lägre än för vatten, tex bensin ca 0,9 g/l, tenderar petroleumprodukter att föreligga i den övre delen av en akvifer.

En förorenings löslighet i vatten är i allmänhet en av de viktiga, dock inte alltid avgörande, faktorerna för ett organiskt ämnes mikrobiologiska tillgänglighet och potentiella nedbrytbarhet. Ju högre vattenlöslighet ett ämne har desto högre är i allmänhet dess mobilitet i vattenfasen, desto lägre adsorption till organiskt material i jord, ofta lägre bioackumulering, desto bättre mikrobiell tillgänglighet och desto högre potentiell biologisk nedbrytbarhet. Alltför hög löslighet, kopplat till hög halt, kan dock ge mikrobiellt toxiska effekter (vad som är hög halt är bl a substans- och organismberoende). Jämförs lösligheten av alifater med aromater finner man att aromater, främst de med högre molekylvikt, har avsevärt högre löslighet än alifater med samma ekvivalenta kolnummer (EC). Tabell 6.2.1 ger beskrivning av en förenklad beräkning av dessa kolväten löslighet. I linje med ovanstående resonemang skulle man härav kunna förmoda att alifater är svårare att bryta ned mikrobiellt, jämfört med aromater med samma EC. Emellertid spelar även bl a mikrobernas enzymatiska system en viktig roll just för nedbrytningen. Eftersom ett mycket större antal olika typer och arter av bakterier har enzymsystem som klarar av att aerobt bryta ned alifater, jämfört med aromater, är detta en av de viktiga faktorerna för att just alifater av främst medeltunga kolväten har relativt snabba nedbrytningsförlopp, jämfört med aromatiska dito.

En annan viktig orsak till att n-alifater är relativt lättnedbrytbara är att de ofta föreligger i emulsioner vilket ger stor yta per volym mot vatten och kan då snabbare lösas och därtill genererar

större yta för bakterierna att attackera än om de inte var emulgerade. Det är därtill inte ovanligt att bakterier kan producera ytaktiva ämnen för att via micellbildning göra alifaterna mer tillgängliga/lösliga/transportabla (Carvalho m. fl., 1997; Banat, 1995). Detta kan avspeglas i att längre n-alkaner har löslighet (ej emulsion) < 0,1 mg/l men deras nedbrytningshastighet överstiger hastigheten för att lösas i vatten.

Även kokpunkten varierar i stort med antal kolatomer i kolkedjan. I princip, ju fler kol desto högre kokpunkt. Alifater mellan n-hexan (C6) till n-pentatriacontan (C35) har kokpunkter inom området 70°C till 500°C.

Tabell 6.2.1. Antal kol i molekylen, ekvivalent kolnummer (Equivalent Carbon Number, EC) och löslighet för olika grupper av alifater och aromater visavi deras EC (Gustafson m. fl., 1996).

Alifater	EC	Aromater	EC	
5-6	5,5	Bensen	6,5	Lösligheten (S) i mg/l och Koc (ml/g) för de olika EC kategorierna kan förenklat uttryckas enligt följande:
>6-8	7,0	Toluen	7,6	
>8-10	9,0	>7-8	7,6	
>10-12	11	>8-10 *	9,0	
>12-16	14	>10-12	11	
>16-35	19	>12-16	14	
		>16-21	19	
		>21-35	28	

$$\begin{aligned} \text{Alifater: } \log_{10}S &= -0,55 \cdot \text{EC} + 4,5 \quad (R^2=0,94) \\ \log_{10}Koc &= 0,45 \cdot \text{EC} + 0,43 \quad (R^2=0,94) \\ \text{Aromater: } \log_{10}S &= -0,21 \cdot \text{EC} + 3,7 \quad (R^2=0,89) \\ \log_{10}Koc &= 0,10 \cdot \text{EC} + 2,3 \quad (R^2=0,94) \end{aligned}$$

\* *Etylbensen och xylen definieras att ingå i denna grupp fastän antal kol i denna grupp är större än 8.*

### 6.2.3. Biologisk nedbrytning

Inledningsvis ges i detta kapitel en generell bild av biologisk nedbrytning av olika alifater, var- efter kapitlet delas in i styckena aerob nedbrytning och anaerob nedbrytning, i vilka en mer ingående beskrivning av kända och föreslagna nedbrytningsförlopp redovisas.

Den kemiska strukturen av ett kolväte är (tillsammans med motsvarande mikrobiella nedbrytningsaktivitet) avgörande för biologisk omvandling varför bl a Bourquin (1989), Dragun (1988), Baker och Herson (1994) och Chapelle (1993) har gett följande tumregler:

n-alkaner i molekyloområdet C1 - C9 är nedbrytbara, men tenderar att vara mer toxiska för mikroorganismerna än motsvarande C10 - C22 kolväten. Vissa specialiserade mikroorganismer (bl a metanotrofer) kan dock enkelt bryta ned kortkedjade n-alkaner (främst metan). Ju lägre antal kol desto större tendens att ett kolväte emellertid istället försvinner genom förångning.

n-alkaner i molekyloområdet C10 - C22 är förhållandevis biologiskt lättnedbrytbara (alltså lättare än de kortare dito). Dessa n-alkaner assimileras in i mikroorganismens cell varefter de bryts ned. Således är jord och vatten förorenade med oljeprodukter innehållande hög andel av dessa kolväten relativt enkla att sanera med biologiska metoder.

n-alkaner i molekyloområdet C > 22 tar längre tid att biologiskt bryta ned än för motsvarande kolväten med C < 22. Vad gäller alkaner inom detta storleksområde oxideras de på ungefär samma sätt som alkaner med C < 22, men nedbrytningen motverkas bl a av deras extremt låga löslighet i

vatten. Mycket långkedjade alkaner, i t ex tyngre oljor, med molekylvikt > 500-600 anses därför vara svårnedbrytbara.

Grenade alkaner (i-alkaner) bryts ned betydligt sämre än motsvarande raka alkaner. Ju mer grenat ett kolväte är desto större är oktantalet och desto större är innehållet av tertiära och kvartära kolatomer, det vill säga kolatomer som är direkt bundna till två eller tre andra kolatomer. Dessa har en rymdstruktur som tenderar att försvåra biologisk nedbrytning (kvartära mycket svårare att bryta ned än tertiära). Höggrenade alkaner med C > 22 finns bl a i bitumen och anses som svårnedbrytbara eftersom de både innehåller högt antal förgreningar och dessutom är ytterst svårslösliga i vatten. Det finns dock uppgifter på att vissa grenade alkaner (tertiära dito) kan brytas ned (*Berekaa och Steinbüchel, 2000*) och har brutits ned nästan lika snabbt som motsvarande raka alkaner (*Swannell och Head, 1994*) (det kan också nämnas att kvartära kol kan oxiderats men i dessa fall har det gällt molekyler som inte enbart består av kol och väte, *Kniemeyer m. fl., 1999*).

Nyligen publicerade resultat indikerar bl a att ovanstående avgränsning, större eller mindre än C22, bör förskjutas mot betydligt högre antal kol (gäller främst n-alkaner) (*Caldwell m. fl., 1998; Huesemann, 1995*).

Alkener och alkyner (alltså omättade alifatiska kolväten som har en eller flera dubbel- och/eller trippelbindningar) kan i princip oxideras men anses svårare att brytas ned jämfört med motsvarande mättat dito. I gruppen alkener finns både raka (n-alkener) och grenade (i-alkener).

Cykloalkaner är svårare att bryta ned än motsvarande n-alkan. Cykloalkaner < C11 har, enligt *Englert m. fl. (1993)*, hög toxisk inverkan på mikroorganismernas cellmembran. Cykloalkaner med få ringar kan i vissa fall brytas ner om två eller flera olika typer av mikroorganismer finns närvarande och samspelar. Ju fler ringar en cykloalkan består av desto mer tenderar den att kvarstanna som en rest efter biologisk sanering av olja. Nya undersökningar har visat att cykloalkaner av flerringad typ är mycket svårnedbrytbara (*Huesemann, 1995*).

Sätts alkanerna in i ett totalscenario avseende biologisk nedbrytning av petroleumprodukter (Tabell 6.2.2) fås att medel-tunga n-alkaner tillhör de ämnen som bryts ned tidigt medan i-alkaner, n- och i-alkener bryts ned senare.

I ovanstående har getts en generaliserad bild av bionedbrytning av alifater och gäller främst för aerob nedbrytning av respektive kolväten. Nedan följer en mer ingående beskrivning av både aeroba och aneroba mikrobiella reaktionssätt vid nedbrytning av alifater.

Tabell 6.2.2. *Principiell och förenklad beskrivning av förändring av innehåll i bensin, diesel och eldningsolja vid bionedbrytning (Zymax Forensics, USA; 2000-12-06).*

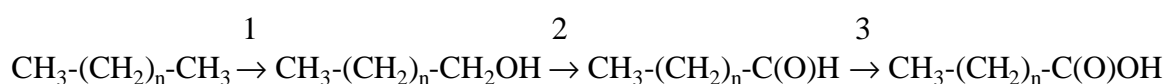
Oljor (Bunker C)	Diesel	Bensin	Mikrobiell prioritering	Kemiskt innehåll
↓	↓	↓	1	Stor andel n-alkaner föreligger
			2	Lätta alkaner avlägsnas (dock främst avdunstning av de allra lättaste)
			3	Medel-tunga n-alkaner, alkener, bensen, toluen avlägsnas
			4	> 90% av n-alkaner avlägsnas
			5	Alkylcyklohexaner, alkylbensener avlägsnas; i-alkaner, n- och i-alkener, naftalen reduceras
			6	i-alkaner, n- och i-alkener, metylnaftalener, alkyl-/bensotiofen avlägsnas; dimetyl-/etyl-naftalener reduceras (selektivt)
			7	Fenantrener, dibensotiofener, PAH'er reduceras
			8	Vanliga steraner avlägsnas (selektivt), C31- till C35-homohopaner reduceras. Tricykliska terpener ökas.
			9	Tricykliska terpenider, diasteraner och aromatiska steraner ökas
			10	Aromatiska steraner och demetylerade hopaner (finns under vissa förhållanden) dominerar

### Aerob nedbrytning

#### Acykliska alfat (här behandlas alkaner och alkener)

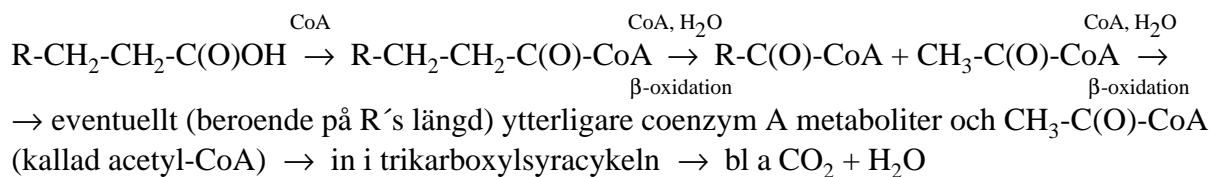
Mikrobiell nedbrytning av alkaner utförs i allmänhet av enzymer med relativt låg molekylspecificitet. Dessa är dock framför allt inriktade på raka kolkedjor, varför delvis grenade (tertiära kol) är mycket svårare att attackera och oxidera och helt grenade (kvartära kol) i princip omöjliga att oxidera. Eftersom nedbrytning av alkaner kan utföras av enzymer som producerar fettsyror (som i princip alla mikroorganismer klarar av att producera) finns dessa enzymer hos ett stort antal olika mikrobiella typer och arter. Dessa finns redan i den jord som kan komma att bli förorenad, eller som redan är förorenad, av alkaner. Nedan ges några exempel på olika enzymatiska attackvägar där C(O) står för ketogrupp (C=O), R står för väte eller kolväte (*Chapelle, 1993; Shigeaki Harayama m. fl., 1999*):

Det mest vanliga angreppssättet är "Terminal oxidation" som bereder vägen för den sk beta-oxidationen ( $\beta$ -oxidation). Nedan visas oxidation av ena alkan-ändan men oxidation kan även ske i båda ändarna.



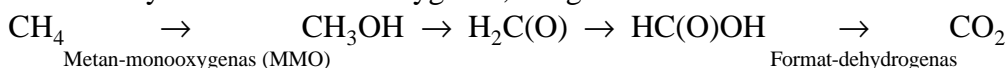
Steg 1 kan mikrobiellt katalyseras av enzymet alkan-monooxygenas, steg 2 av fett-alkohol dehydrogenas och steg 3 av fett-aldehyd dehydrogenas.

Ett stort antal olika aeroba bakterier är kapabla att utnyttja de härigenom bildade karboxylsyrorna genom  $\beta$ -oxidation, med hjälp av coenzym A (CoA) enligt:



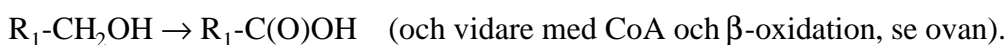
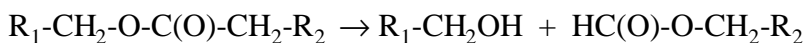
Eftersom  $\beta$ -oxidation sannolikt inte sker i någon nämnvärd utsträckning under abiotiska (icke-biologiska) processer är denna typ av reaktion en god indikation på biologisk nedbrytning.

Ett specialfall av mikrobiell nedbrytning av alifater är nedbrytning av metan som kan attackeras, t ex av enzymet metan-monooxygenas, enligt:



Vid denna aeroba nedbrytning av metan bildas metanol, formaldehyd och format som slutligen mineraliseras.

Ett alternativ till terminal oxidation är sub-terminal oxidation, resulterande i olika oxiderade mellanprodukter:



Enligt *Whyte m. fl. (1998)* finns det angivet i litteraturen (flertal hänvisningar ges) att n-alkaner även kan brytas ned med hjälp av dioxygenas enzym. Härvid oxideras n-alkaner initialt till motsvarande hydroperoxider, med efterföljande transformation till aldehyder och alkoholer.

Som nämnts ovan är grenade alifater med tertiära koltomer betydligt svårare att brytas ned än ogrenade (och kvartära koltomer i princip omöjliga att attackera, se t ex *Morgan och Watkinson, 1994; Hammond och Alexander, 1972*). Inte alltför sällan är det  $\beta$ -oxidationssteget som i sådana fall inte kan genomföras. Eftersom petroleumprodukter, i mer eller mindre utsträckning, innehåller dessa grenade kolväten (utvinns/produceras av raffinaderierna och tillsätts till drivmedel för att höja oktantalet) och att dessa ofta inte genomgår fullständig oxidation och mineralisering, tenderar dessa ofta att finnas kvar länge tid (än raka alkaner) i mark och vatten efter ett spill. Detta har i vissa fall gått att använda för att undersöka hur stor andel av förorening som har brutits ned biologiskt. Härav jämförs ofta vissa raka kolväten i föroreningen med motsvarande mer svårnedbrytbara grenade kolväten. Om föroreningen saknar något/några av dessa kolväten kan de eventuellt initialt tillsättas. Dessa båda typer av kolväten skall i övrigt ha så lika fysikaliska egenskaper som möjligt (flyktighet, förångningstemperatur etc). Här har exempelvis de grenade alifatiska kolvätena pristan eller fytan (båda innehåller tertiära kol) använts som standard. Reduktionshastigheten av dessa sätts då i relation till motsvarande raka alkaner (n-C17/pristan resp. n-C18/fytan; dessa n-alkaner brukar användas fastän de har mindre antal C än motsvarande grenat kolväte) i föroreningen. Man kan då få en uppskattning av hur stor andel av det raka kolvätet som biologiskt bryts ned, i förhållande till andelen som avgår till atmosfären, inkorporeras i materialet etc.

Denna jämförande test är emellertid inte alltid pålitlig eftersom grenade kolväten i vissa fall påvisats brytas ned i signifikant grad (se t ex *Sundaesan m. fl.*, 1997; *Nakajima m. fl.*, 1985; *Seubert och Fass*, 1964). Attacken baseras på att initialt avlägsna grenade metylgrupper genom komplexa, och för varje alkyl-grypp specifika, reaktionssätt (specifik med avseende på hur den tredimensionellt är placerad på kolkjedjan). Attacken genomförs med hjälp av motsvarande enzymssystem, med efterföljande produktion av karboxylsyror, enligt ovan. I de fall man har en mikrobiell kultur som visar sig kapabel att bryta ned grenade kolväten kan man alternativt använda det mycket svårnedbrytbara  $17\alpha(H),21\beta(4)$ -hopan, cyklisk femringad alkan, som standard. GC/MS undersökningen får då normaliseras mot hopan. På senare tid har man alltmer använt hopan som nedbrytningsmarkör, och allt mindre grad det sämre alternativet pristan och fytan (sämre just på ökad rapportering att dessa kan brytas ned i betydande omfattning).

Ett annat sätt att erhålla indikationer på nedbrytning av alifater är att mäta produktion av alifatiska karboxylsyror eftersom dessa bildas, se ovan, som intermediärer vid nedbrytningsprocessen (*Watson m. fl.*, 1999).

Alifatiska alkener (omättade kolväten innehållande kol-koldubbelbindning (C=C)) kan brytas ned på flera sätt, av vilka några liknar ovanstående terminala oxidation. Ofta förekommer större variation av producerade mellanprodukter, men en av de mer vanliga initiala angreppssätten är att oxidera den omättade bindningen, varvid en peroxid-grupp bildas. Peroxider är oftast toxiska vilket hypotetiskt kan vara en orsak till att omättade alifater synes brytas ned och mineraliseras sämre än mättade dito.

Utöver ovanstående finns ytterligare några, dock mindre vanliga, mikrobiella aeroba attackvägar för alifater föreslagna (*Britton*, 1984).

De flesta studier avseende aerob nedbrytning av alifater har utförts vid relativt varma förhållanden. Det finns emellertid bakterier som utför densamma vid låga temperaturer. *Whyte m. fl.* (1998) fann en bakterie som i kallt klimat (0-5 °C) kunde bryta ned och fullständigt mineralisera n-alkaner och därtill, dock i mycket mindre utsträckning, även några grenade alkaner (5 °C). Därtill har man funnit "kallt-klimat aktiva" bakterier som har två parallella enzymssystem varav den ena kan bryta ned alifater och den andra aromater (*Whyte m. fl.*, 1997). Ytterligare indikationer på att alifater kan brytas ned i kallt klimat ges av *Prince m. fl.* (1999).

#### Alicykliska alifater (här enklare cykloalkaner)

Alicykliska kolväten, t ex cyklohexan, har visat sig kunna brytas ned mikrobiellt, främst genom en Kooperation mellan mikroorganismer (konsortium), vilka har olika typer av enzym (*Chapelle*, 1993). Reaktionerna synes främst utföras med en co-oxidation (ämnet bryts ned tillsammans med annat primärt ämne, enzymet designat att bryta ned primärämnet men den cykliska alifaten bryts ned parallellt). *Keck m. fl.* (1989) omnämner att cyklohexan kan attackeras cometaboliskt av *Mycobacterium vaccae* JOB 5, med hjälp av propan. Den relativt stora variationen av alicykliska kolväten kan ge upphov till flera teoretiska nedbrytningssätt. Ett sätt som vanligtvis beskrivs är att kolvätet först överförs till en cykloalkohol (i cyklohexans fall till cyklohexanol) med efterföljande bildning av en cykloketon. Därefter attackeras och katalyseras monooxygenas (MO) insättandet av ett syre i ringen. Efterföljande ringöppning sker med hjälp av hydrolasenzym och produkten transformeras vidare till en dikarboxylsyra (*Trudgill*, 1984; *Shigeaki Harayama m. fl.*, 1999). Enligt den sistnämnda referensen, som hänvisar till *Morgan och Watkinson* (1994), synes substituerade cykloalkaner lättare brytas ned mikrobiellt jämfört med osubstituerade dito.



### *Anaerob nedbrytning*

Det föreligger i avsevärt mindre omfattning undersökningsresultat avseende anaerob nedbrytning av alkaner, relativt aerob dito. Generellt sett sker anaeroba reaktioner långsammare än aeroba. Det var inte speciellt länge sedan som man var osäker på om anaerob nedbrytning av alifater över huvud taget förelåg i någon signifikant omfattning. På senare tid har man emellertid genom ökat antal undersökningar funnit att alifater verkligen kan brytas ned anaerobt. Mikroorganismer är de enda medlemmarna i vår biosfär som kan utföra respiratoriska funktioner med andra elektron acceptorer än syre, t ex med nitrat, trevärt järn, sulfat och koldioxid. Signifikanta kunskapsluckor finns dock än idag vad gäller de mikrobiella mekanismerna vid användandet av dessa alternativa elektronacceptorer vid nedbrytning av alkaner.

Relativt tidigt föreslogs att initial anaerob mikrobiell nedbrytning av alkaner genererade alkener, men reaktionerna tycktes inte kunna användas för mikrobiell tillväxt (*Griffin och Traxler, 1981*). På senare tid har allt fler rapporterat om nedbrytning av alkaner under anaeroba förhållanden. I de flesta fall har mikrobiella sulfatreducerare används (har i de flesta fall erhållits från petroleumförorenade sediment), men i några fall finns det även rapporterat om mikrobiellt användande av övriga anaeroba elektronacceptorer (se t ex *Holliger och Zehnder, 1996*). Det senare fallet kan hypotetiskt förekomma i akviferer eller andra vattenområden med låga sulfathalter men som istället innehåller t ex  $\text{Fe}^{3+}$  och/eller nitrat.

*Hunkeler m. fl. (1998)* fann indirekta indikationer på omfattande nedbrytning av n-alkaner (parallellt med nedbrytning av aromater), medan i-alkaner synes ha hög motsträvighet mot nedbrytning, under anaeroba laborativa förhållanden i dieselförorenat akvifermaterial. Exakt vilken/vilka elektronacceptorer som mikroberna använde angavs inte men total haltreduktion av de flesta anaeroba elektronacceptorerna erhöles. Vidare bevisade *Caldwell m. fl. (1998)* att n-alkaner ända upp till C34 kan mineraliseras från vädrad råolja under sulfat-reducerande förhållanden, med tillsats av mikroorganismer från marina sediment. Intressant noterades även signifikant nedbrytning av pristan och fytan (flergrenade C19- och C20-alkaner).

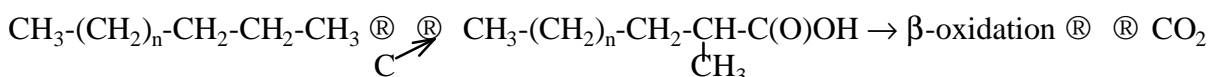
*Grishchenkov m. fl. (1999)* fann att sk fakulativt anaeroba bakterier, här *Pseudomonas* sp. och *Brevibacillus* sp., efter 10 dagar hade aerobt brutit ned 90-95 % av de n-alkaner som fanns i, till 25% vädrad, arabisk råolja (Arabian light crude oil). Dessa n-alkaner låg inom intervallet C10-C35. Fakulativa anaerober kan leva både under aeroba och vissa anaeroba förhållanden (nitrat-, järn- och mangan-reducerande förhållanden). Detta i motsats till strikt anaeroba mikroorganismer som inte kan leva under aeroba förhållanden men som istället kan använda bl a sulfat och koldioxid som elektronacceptorer. Under anaeroba, nitrat-reducerande förhållanden, kunde dessa fakulativa anaerober inom 50 dagar bryta ned ca 25-30 % av n-alkaner inom intervallet C11-C14 och ca 20-25% n-alkaner inom intervallet C15-C18. Indirekta indikationer fanns att nedbrytningen eventuellt gick signifikant snabbare än 50 dagar.

*Aeckersberg m. fl. (1998)* fann att två mesofila (förklaring, se nästa stycke) sulfat-reducerare (bakteriestammarna benämndes Pnd3 och Hxd3), isolerade från ett marint sediment och en oljetank, tillväxte på n-alkaner upp till C17 respektive C20, under bildandet av bl a sulfid. Man fann att de båda stammarna attackerade n-alkaner olika under det initiala reaktionssteget. Den ena stammen (Hxd3) gav fettsyror med udda antal kol då n-alkaner med jämnt antal kol tillfördes. Den andra stammen gav tvärtom fettsyror med jämna antal kol från n-alkaner med jämna antal kol. Man spekulerade i om mikroorganismerna i det ena fallet eventuellt tillförde kol till de inledande reaktionerna innan produkterna mineraliserades. I båda fallen erhöles resultat som visade annat angreppssätt än det som föreslagits av *Morikawa m. fl. (1996)*. De sistnämnda fann att

anaerob alkan nedbrytning skulle kunna gå via bildandet av 1-alken av en bakterie (HD-1) som även utnyttjade CO<sub>2</sub> (alkenproduktion av alkan beskrevs redan av *Britton, 1984*).

Ovan nämns mesofila bakterier. Mesofila mikroorganismer har en optimal nedbrytningstemperatur mellan 25-40 °C (*Baker och Herson, 1994*). Emellertid finns andra typer av mikroorganismer, så kallade psykofiler (ibland även kallade kryofiler, köldälskare), som har ett betydligt lägre optimum, 5-15 °C (kan troligtvis för vissa eventuellt vara ännu lägre), i motsats till termofiler (värmeälskare) som har optimum över 40 °C (ibland anges 40-60 °C med det finns troligtvis de som har högre optimum). Termofiler kan anrikas vid bl a kompostering. Alla tre typerna har visat sig kunna bryta ned organiska föroreningar.

Ett år senare presenterade *So och Young (1999a; 1999b)* en alkan-nedbrytande sulfat-reducerande bakterie (AK-01, isolerad från petroleumförorenat sediment) som transformerade alkaner till monokarboxylinnehållande fettsyror. Denna mikroorganism kunde använda alkaner för sin tillväxt, varvid antalet bakterier fördubblades på tre dagar (bas: hexadekan). Alkanerna mineraliserades fullständigt. De alkaner som bakterien utnyttjade låg inom intervallet n-C13 till n-C18. Det reaktionssätt som härvid föreslås innefattar inkorporering av en metylgrupp i samband med bildandet av karboxylgruppen enligt:



Varifrån mikroorganismen tar, det på position C-2 inkorporerade, kolet är ännu inte klarlagt.

### 6.3. Monoaromater och PAH

#### 6.3.1. Inledning

Namnet aromatisk kommer av att ett flertal aromatiska föreningar (långt ifrån alla) har en angenäm doft. Olika aromater kan fås från bl a stenkolstjära och råolja. Aromaterna har ett stort användningsområde inom industrin som t ex lösningsmedel, bas till en del läkemedel, plaster, bekämpningsmedel, sprängämnen, o s v. Polycykliska aromatiska kolväten (PAH) kan härledas till petrogena material (och pyrogena mtrl), men PAH från petrogena material har mer av alkylerade PAH (t ex metyl-naftalen) i förhållande till icke-alkylerade PAH (t ex naftalen). Därtill genererar förbränning av fossila bränslen pyrogena material med innehåll av PAH'er som i allmänhet saknar alkylgrupper (*Zeng och Vista, 1995*).

#### 6.3.2. Kemisk struktur och egenskaper

Grundstommen i monoaromater (MAH) och polycykliska aromatiska kolväten (PAH) är bensen. Bensenmolekylen består av sex kolatomer, sex väteatomer och ett gemensamt "elektronmoln" (π-elektroner) som ger den aromatiska strukturen på molekylen.

En eller flera av väteatomerna hos MAH och PAH kan vara substituerade mot olika funktionella grupper. För MAH gäller att om en av väteatomerna byts ut mot t ex en alkoholgrupp (OH) får man en fenol, byts vätet istället ut mot en metylgrupp (CH<sub>3</sub>) så fås toluen, mot en etylgrupp fås etylbensen o s v. Även flera av väteatomerna kan bytas ut och ger på så sätt ett oräkneligt antal av olika kombinationer, exempelvis är ftalater saltet av ftalsyra, där två av bensenets väteatomer

bytt ut mot karboxylsyragrupper (-COOH), om två väteatomer istället byts ut mot metylgrupper fås xylener.

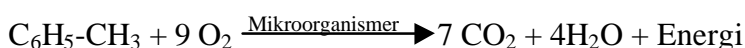
En del MAH:er anses som mycket cancerogena och dessa används numera i betydligt mindre omfattning inom industrin än tidigare (t ex bensen). Kontamination från bränslen är en av de vanligare grundvattenföroreningarna. Vatten som har varit i kontakt med ett oljebaserat bränsle (bensin, diesel, eldningsolja o s v) innehåller ofta höga halter BTEX (bensen, toluen, etylbensen och xylen) som är en fraktion med hög löslighet i vatten (bensen högst med ca 1,78 g/l, *Brown m. fl., 1999*).

PAH består av två eller flera bensenringar förenade med kol-kol  $\pi$ -bindning, där två ringar bildar naftalen och tre ringar bildar t ex antracen. Även här kan väteatomerna bytas ut och bildar därmed ett oräkneligt antal olika föreningar. PAH finns som nämnt ovan i stenkolstjära och råolja, PAH:er bildas även vid ofullständig förbränning av organiskt material, t ex orenade dieselavgaser, framställning av koks och aluminium (grafitelektroder), vedeldning, skogsbränder, sopförbränning o s v. Detta gör att man kan finna PAH:er på de mest skilda platser i naturen; en del naturligt förekommande, andra av antropoget ursprung. PAH:er är en mycket komplex grupp, generellt fettlösliga, ofta stabila, några cancerogena och i en del fall bioackumulerande. Ett flertal organismer metaboliserar PAH:er relativt snabbt, ett undantag är musslor, vilket gör att musslor kan innehålla höga koncentrationer PAH som lagras i vävnaden.

De flesta PAH:er betecknas som relativt oskyldiga men en del har en oomtvistad skadeverkan. De främsta skadeverkande egenskaperna hos PAH:er anses vara att en del är cancerogena. Man beräknar att i Sverige orsakar PAH 10-100 fall cancer per år (*Naturvårdverket, 1998*). Att PAH orsakar lungcancer är vedertaget och man förmodar att även andra vävnader kan bli drabbade. Andra förmodade negativa verkningar av PAH är att det kan fungera som signalsubstans och därmed störa proteinsyntesen och eventuellt ge hormonstörningar (*Naturvårdverket, 1998*). En nackdel med en snabb metabolisering är ibland att metaboliterna från PAH (t ex bens(a)pyren) kan få mer toxiska egenskaper än moderföreningen. Generellt kan sägas att lipofiliteten (fettlösligheten), motståndskraften mot miljön och toxiciteten för generna ökar när PAH molekylerna ökar i storlek (*Cerniglia, 1992*) och lösligheten i vatten minskar (*Brown m. fl., 1999*). Det tycks också som att giftigheten går mot kronisk giftighet och primär cancer när storleken kommit till fyra fem bensenringar (*Cerniglia, 1992* och referenser däri).

### 6.3.3. Biologisk nedbrytning

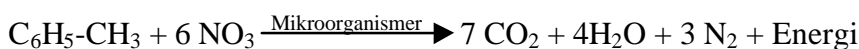
**Aerob, biologisk nedbrytning** av toluen kan åskådliggöras teoretiskt enligt formeln:



Nitrat brukar anses som mycket betydelsefullt vid nedbrytningen av MAH i grundvatten p g a att stora mängder nitrat kan finnas löst i vattnet, t ex så är lösligheten för natriumnitrat 92 g/l jämfört med syrets ca 10 mg/l (*Reinhard, 1994*).

Experiment har visat att BTEX bryts ner i turordning vid denitrifikationen. Toluen är den förening som bryts ner först följt av p- och m-xylen, etylbensen och o-xylen (*Reinhard, 1994*, och referenser däri). Angående bensen finns det delade meningar, en del forskare hävdar att bensen inte är biologiskt nedbrytbart med denitrifikation, medan andra säger sig ha starka indikationer på att bensen kan brytas ner (*Borden, 1994*, och referenser däri).

Biologisk nedbrytning av toluen genom denitrifikation, kan åskådliggöras teoretiskt enligt formeln:



Mikroorganismer kan utnyttja trevärt järn för att oxidera t ex toluen, fenol, bensoat m fl (*Borden, 1994*, och referenser däri). Användandet av Fe<sup>3+</sup> vid nedbrytning av toluen kan beskrivas enligt (föreslaget av *Borden, 1994*):



Man kan även tänka sig en användning av järnoxyhydroxid (FeOOH) istället för järntrihydroxid (Fe(OH)<sub>3</sub>), varvid den teoretiska formeln skulle bli något annorlunda.

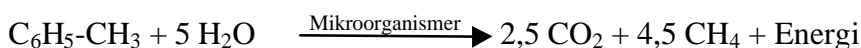
### **Sulfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)**

En del "besvärliga" organiska föreningar har visat sig kunna brytas ner av svavelreducerande bakterier. Det antas av *Edwards och Grbic-Galic (1992)* att sulfat var elektronacceptor vid mineralisering av bensen i deras studie. Även vid oxidering med sulfat som elektronacceptor, kan man se att toluen är den substans som föredras av mikroorganismerna i BTEX följd av p-xylen och o-xylen. Etylbensen och bensen visade först inga tecken på nedbrytning, men efter 30 dagar med anoxiska förhållanden kunde man observera en mineralisering av bensen (*Edwards och Grbic-Galic, 1992*). Biologisk nedbrytning av toluen genom sulfatreduktion, kan åskådliggöras teoretiskt enligt formeln (*Beller m. fl., 1992*):



### **Fermentation**

Redan 1987 visade *Grbic-Galic och Vogel (1987)* att flera aromater kan bli transformerade till koldioxid och metan under metanogena konditioner. Föreslagen formel för nedbrytningen av toluen är:



Den mikrobiologiska nedbrytningen av polycykliska aromatiska kolväten (PAH) utförs av en skiftande grupp av mikroorganismer bestående av bakterier, svampar och alger. Tidigare ansågs att molekyllärt syre var nödvändigt för den första hydroxyleringen av PAH (*Cerniglia, 1992*). Under senare tid har man dock visat att det även kan förekomma en strikt anaerob mineralisering av PAH (*Coates m. fl., 1996; Coates m. fl., 1997*). I motsats till bakterier så använder svampar hydroxyleringen till att avgifta snarare än till sin katabolism och assimilering. Mikrobiell nedbrytning av PAH:er är en av huvudprocesserna för dekontaminering av kontaminerade sediment och ytligt liggande jordlager. PAH:erna kan bli fullständigt mineraliserade eller delvis transformerade av en grupp mikroorganismer eller av enskilda mikroorganismer. Redan i början av 1990-talet ansågs det att biosanering av jordar kontaminerade av PAH:er var ett alternativ till traditionella metoder, som förbränning vid avgiftning av farligt avfall (*Aronstein m. fl., 1991; Ellis m. fl., 1991*). Biologisk nedbrytning av individuella kolväten är relaterad till dess kemiska struktur, grad av aromatisering, koncentration och fysiokemiska parametrar (*Cerniglia, 1992*).

Generella principer vid metabolisering av PAH:er är beskrivna av *Cerniglia (1992)* (och referenser däri). De flesta av dem är fortfarande gällande.

1. Ett mångfald av olika bakterier, svampar och alger har förmågan att metabolisera PAH:er. Generellt kan man säga att nedbrytningshastigheten är omvänt proportionellt mot antalet ringar i PAH-molekylen. PAH:er med låg molekylvikt bryts ner snabbare än de med hög vikt.
2. Den mikrobiologiska nedbrytningen av PAH:er som naftalen, fenantren, antracen och ace-naften är väl dokumenterade och de biokemiska vägarna är kända. Det är mindre känt om mikroorganismers förmåga att använda PAH:er med hög molekylvikt som kol och energi-källa.
3. Den biologiska nedbrytningsmekanismen, både eukaryot och prokaryot, behöver närvaro av molekylärt syre för att initiera en enzymatisk attack på PAH-ringar. Andra enzymssystem som t ex metanmonooxygenas (MMO) och ligninperoxidas kan också vara av intresse vid katabolismen av PAH. Det finns också ett ökande intresse av anaerob nedbrytning av PAH:er.
4. Det har rapporterats inblandning av plasmider vid nedbrytning av toluen, naftalen, bifenyl och fenantren. Några kataboliska gener med tillhörande regulatoriska gener har blivit analyserade. Dock är lite känt angående gener och regulations mekanismer ingående vid bakteriologisk nedbrytning av PAH:er med hög molekylvikt.
5. PAH:er med låg molekylvikt, t ex naftalen och fenantren, bryts ner relativt snabbt i sediment, medan tyngre PAH:er, t ex bensoantracen, krysen och bens(a)pyren tycks vara ganska resistent mot mikrobiologiska attacker. Den potentiella biologiska nedbrytningshastigheten för PAH:er är högre i PAH-kontaminerat sediment än i ofördärvat sediment.
6. Fintrådiga svampar hydroxylerar PAH:er som en inledning till detoxifiering medan bakterier för det mesta oxiderar PAH:er för kol assimilation. Liksom bakterier är svamp metabolismen av PAH:er mycket regio- och stereoselektiv.
7. Mikrobiologisk nedbrytning av PAH:er i akvatisk respektive terrester miljö är starkt påverkad av en mängd abiotiska och biotiska parametrar som; temperatur, pH, jordtyp, lufttillförsel, närsalter, djup, diffusion, mikrobiell anpassning, biotillgänglighet, tidigare kemisk exponering, vattentillgång, sedimentets toxicitet, fysiska-kemiska parametrar av PAH:t, koncentration av PAH och årstids faktorer.

Ett klart tecken på att de yttre betingelserna har stor påverkan på mineraliseringen är att teoretiska resultat ofta avviker från experimentellt erhållna. Ofta åtgår det betydligt mer syre i förhållande till mängd kol vid nedbrytning av PAH:er än de teoretiska ca tre gångerna. *Haeseler m. fl. (1999)* har vid nedbrytning av PAH i praktiska försök uppmätt en åtgång på mer än 16 ggr så mycket syre som nedbrutet kol för vissa jordar (kan ev. bl a vara en funktion av naturlig organiskt innehåll). *Thomsen m. fl. (1999)* har visat att quinolin kan brytas ner fullständigt på 7 till 10 dagar, oberoende av pH (pH 5,8 och 7,2).

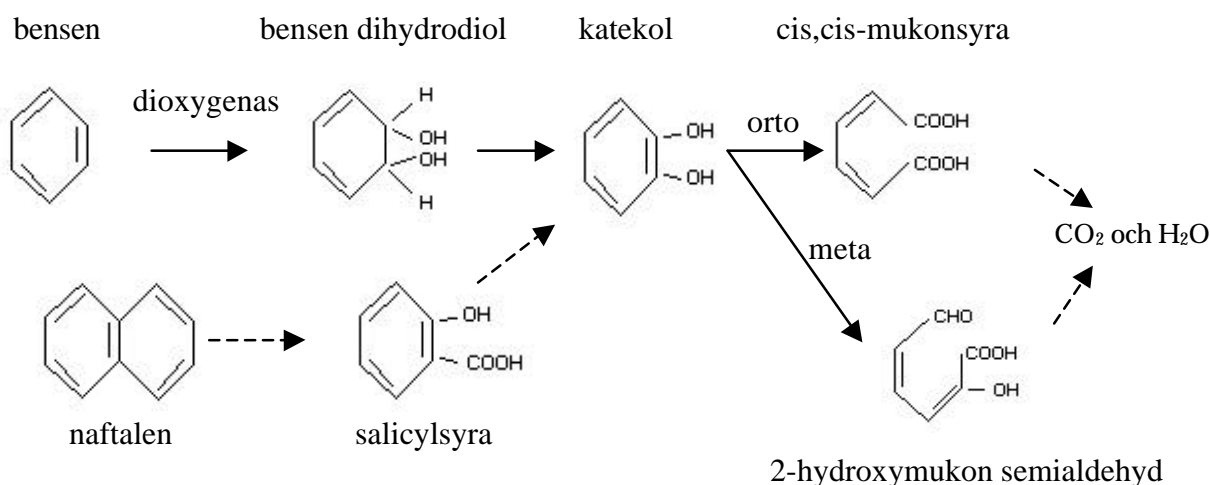
Möjliga aeroba och anaeroba reaktionssätt avseende mikrobiell nedbrytning av MAH och PAH finns beskrivna i bl a *Larsson m. fl. (1994)*. I det följande ges först ett kortfattat extrakt från nämnda referens, varefter följer resultat från litteraturstudie avseende nya rön om mikrobiell nedbrytning av MAH och PAH.

Det är av betydelse att känna till vilka mellanprodukter/intermediärer som kan bildas vid nedbrytning av aromater. Kunskapen kan bl a användas till att få indirekta bevis på om förlust av aromaterna beror av biologisk nedbrytning eller ej. Exempelvis är det känt att katekoler bildas vid nedbrytning av både MAH och PAH, och att även salicylsyra bildas som intermediär under PAH nedbrytning. Vid behov kan bl a dessa ämnen analyseras med målsättningen att erhålla indikation på biologisk aromatnedbrytning. *Iacondini m. fl. (1999)* ger exempel på ett antal olika

nedbrytningsprodukter (intermediärer) som kan användas som indikatorparametrar för bionedbrytning av toluen. Ytterligare exempel på potentiella intermediärer, både för toluen och andra aromatiska föreningar, kan fås i *Gibson och Subramanian (1984)*.

Det vedertagna oxidativa angreppssättet på aromatiska kolväten kan i princip beskrivas utifrån nedbrytning av bensen enligt förenklad beskrivning i Figur 6.3.1. Av bensen kan initialt bildas en dihydrodiol av enzymet bensen-dioxygenas, med efterföljande bildning av katekol. Denna intermediärs två hydroxylgrupper (OH-grupper) destabiliserar den aromatiska ringstrukturen och gör den mer tillgänglig för ringöppning. Det finns även alternativt möjlighet att fenol bildas (gäller främst anaerobt) i stället för diolen som även den kan transformeras till katekol.

I de fall ett av bensenringens väte är substituerat med kort alifatisk kolvätegrupp (t ex metylgrupp resulterande i toluen) eller två sådana grupper (t ex två metylgrupper resulterande i xylen) kan härifrån bildad katekol i vissa fall ha kvar denna/dessa grupp/-er. I toluenfallet är den då placerad på ett av ringkolen intill någon av hydroxylgrupperna och i xylenfallet sitter hydroxylgrupperna i orto- och meta-ställning. Dock finns alternativa nedbrytningsätt för bl a xylenet, exempelvis inledningsvis kan i stället en av metylgrupperna oxideras till alkoholgrupp (*Gibson, 1984*). I alla fallen bildas dock i efterföljande steg någon form av katekol (katekol, metylkatekol eller dimetylkatekol).



**Orto-vägen kan katalyseras av enzymet dioxygenas. Orto-vägen kallas även  $\beta$ -ketoacidvägen. Meta-vägen kan katalyseras av enzymet 1,2-dihydrogenas.**

Figur 6.3.1. Förenklad beskrivning av aerob bakteriell nedbrytning av bensen och PAH.

PAHer bryts på liknande sätt, som för bensen, ned till bl a katekol men där är föregångsmolekylen främst salicylsyra. Därtill kan även gentissyra bildas som alternativ till katekolen (gentissyra har, i förhållande till salicylsyran ytterligare en OH-grupp på ringen och där de då båda OH-grupperna sitter i para-ställning).

Katekolen kan attackeras på två olika sätt, orto och meta (se Figur 6.3.1). I orto-fallet bildas ringöppnad cis,cis-mukonsyra, med efterföljande bildning av  $\beta$ -ketoacid. I meta-fallet katalyserar enzymkomplexet katekol-2,3-dioxygenas införandet av två syreatomer.

Generellt sett finns vissa mikrobiella enzymatiska attacker som avviker från ovanstående men analys av katekoler kan ändå anses som ett acceptabelt sätt att få information avseende eventuell biologisk nedbrytning. Omvänd bevisföring gäller härav ej. Om katekoler inte detekteras är detta inte bevis på att ingen nedbrytning sker.

Olika enzym kan därefter tar över och öppna katekol-ringen. Produkter är organiska syror, vilka vidare slutgiltigt enzymatiskt katalyseras till koldioxid och vatten i cellens energiproduktions-system. Produktion av dessa organiska syror sänker pH.

Mikrobiell anaerob nedbrytning av aromater anses främst ske med aromater med mindre än fyra ringar och kan ske på ett flertal olika sätt (*Vogel och Grbic-Galic, 1986; Stoner, 1994; INET, 1993*). Anaerob nedbrytning av aromater sker mycket långsammare än under aeroba förhållanden och det är i princip enbart för MAH som nedbrytning kan ske med tillfredsställande hastighet.

Generellt sett finns två olika huvudsätt avseende nedbrytning av PAHer rapporterade. Den ena, direkt metabolism, innebär att mikroorganismen innehar enzymesystem som kan användas för att omvandla specifikt PAH till energi och kolkälla. Alternativt kan PAHer brytas ned co-metaboliskt. Härvid krävs annan kolkälla som aktiverar enzym som i sin tur kan bryta ned specifik/-a PAH. Nedbrytningen sker då utan att PAH utnyttjas som energi och kolkälla. Exempelvis fann *Ho m. fl. (1995)* i jordprover från USA, Tyskland och Norge några mikroorganismer som var kapabla att utnyttja pyren och/eller fluoranten metaboliskt, medan huvuddelen av de isolerade mikroorganismerna enbart kunde bryta ned dessa och andra PAH co-metaboliskt. Vid sanering av kreasotförorenat område är det därför av stor vikt att klarlägga vilka organiska ämnen som kan stimulera platspecifikt nedbrytning av PAHer (med platspecifikt menas att de kan variera från plats till plats). Fullskalesanering med mikrobiella metoder bör alltså inkludera laborativa tester för att finna lämpligt tillsatsmedel. Intressant att notera är att det finns indikationer på att vissa PAHer kan ingå i den samling av ämnen som kan stimulera nedbrytning av andra PAHer. Exempelvis kan naftalen, fenantren och fluoranten inducera (starta eller upprätthålla) produktion av det/de enzym som bryter ned andra PAHer co-metaboliskt (*Ye m. fl., 1996; Keck m. fl., 1989*). Förutom själva PAHerna kan även intermediärer i vissa fall verka som stimulerare/inducerare.

Även vissa svampar kan bryta ned PAHer. Dessa har dock andra angreppssätt och arbetar främst med extracellulär nedbrytning genom initial oxidation till epoxider. Speciellt populär har vitrötesvampen *Phanerochaete chrysosporium* blivit. Gruppen vitrötesvampar har visat sig ha bio-nedbrytningskapaciteter, associerade till bl a produktion av en grupp av enzym kallade ligninperoxidaser, eller ligninaser, vilka bryter ned aromatiska strukturer i lignin. Eftersom lignin är en komplex molekyl besitter ligninaser låg specificitet med avseende på nedbrytbart ämne. Ligninaser sekreteras från svampens mycel i en inaktiv form vilken måste oxideras för att bli aktiv, vilket i normala fall sker med hjälp av, från svampen sekreterad, väteperoxid. I aktiverad form kan ligninaser extracellulärt oxidera ett brett spektrum av organiska ämnen, men föredrar att oxidera eget sekreterat veratryl alkohol. Detta resulterar i fria radikaler, det vill säga reaktiva intermediärer kapabla att katalysera oxidationsreaktioner. De fria radikalerna består främst av hydroxylradikaler.

Ligninasproduktion är optimal främst då svampen har kvävebrist, men även produktion vid brist på svavel och kol finns rapporterat. Nedbrytning av lignin ingår som en sekundär metabolisk reaktion, vilket innebär att primärt lättnedbrytbart ämne, exempelvis glukos (i mycket små kon-

centrationer, millimolar) eller cellulosa, måste vara närvarande för att väteperoxid skall kunna bildas av glukosoxidas enzym (*Carberry, 1994*).

Den höga reaktiviteten av veratryl alkohols fria radikalkatjoner kan användas för att katalysera initial oxidation av aromatiska ringar, ingående i t ex PAH. Bens(a)pyren kan härigenom omvandlas till bl a motsvarande fri radikalkatjon, vilken i sin tur genomgår flera efterföljande hydrolys- och oxidationssteg, under bildning av bl a bens(a)pyren kinon (*McFarland m. fl., 1992*). Sådana kinoner kan i sin tur bl a reagera med, och inkorporeras i, humus men kan även undergå bakteriell mineralisation, beroende på kemiska och fysikaliska faktorer i jorden och existerande mikroflora. I de fall inkorporering i humus sker, kan fortsatt nedbrytning av ämnet försvåras.

*Sanglard m. fl. (1986)* visade att vitrötesvampen *Phanerochaete chrysosporium* kunde bryta ned bens(a)pyren. *Bumpus (1989)* visade att *P. chrysosporium* var kapabel att reducera halten av 22 aromatiska komponenter i antracenolja. Indikationer har erhållits att reduktionen inte innebär mineralisering, utan istället inkorporering av intermediärer i bärarmatrisen. T ex undersökte *McFarland m. fl. (1992)* svampen *P. chrysosporium*s möjligheter att i en kompost bryta ned och mineralisera bens(a)pyren. Man fann ingen signifikativ mineralisering och resultaten indikerade association av intermediärer till kompostmatrisen. Tidigare erfarenheter hade visat att signifikanta mängder av <sup>14</sup>C-föreningar (ursprungligen från <sup>14</sup>C-märkt bens(a)pyren) bands irreversibelt till jord då denna typ av svamp tillsattes, medan ingen bindning till jord erhöles då svampen utelämnades. Enligt författarna kan metoden med fördel användas om man vill immobilisera tyngre PAH i jord.

Man har på senare tid funnit indikationer på att svampar kan oxidera PAH, på andra sätt än via lignin-peroxidaser. Det tycks till och med vara så att användandet av peroxidaser för nedbrytning av vissa PAH eventuellt är av underordnad betydelse. Istället eller parallellt tycks oxidation ske med hjälp av monooxygenaser i svampens mycel, under initial bildning av epoxider, med efterföljande produktion av *trans*-dihydro-dioler och *trans*-tetrahydro-tetraoler. Den extracellulära produktionen av kinoner är då obetydlig. Som exempel på kan nämnas att *Sutherland m. fl. (1991)* fann indikationer på att *P. chrysosporium*s oxidation av fenantren inte enbart är beroende av ligninasaktivitet. Snarare synes monooxygenas- och epoxidhydras- enzymer från svampen katalysera den initiella bildningen av ostabila PAH-oxider. Dessa transformeras därefter till *trans*-dihydrodioler, eller i vissa fall isomeriseras till fenoler (*Baker, 1994*). Identifierade intermediärer var bl a fenantren-*trans*-9,10-dihydrodiol och -*trans*-3,4-dihydrodiol och därtill 9-, 3- och 4-fenantrol.

*Field m. fl. (1993)* har gjort en sammanställning av svampars enzymatiska användning vid nedbrytning av bl a PAH. Man har funnit att i de fall svampar utnyttjar ligninolytisk metabolism har främst lignin-peroxidaser rapporterats vara det aktiva enzymet. Man har emellertid funnit att ett flertal PAH'er kan oxideras av mangan-joner, vilket enligt författarna skulle kunna ge teoretiska möjligheter att även manganberoende peroxidaser kan ha PAH-nedbrytande aktiviteter.

Ibland kan ett enzym bilda en mellanprodukt som är mer toxisk än ursprungsmaterialet. Som exempel kan nämnas att vitrötesvampen *P. chrysosporium* kan oxidera det icke-mutagena PAH-et pyren till mutagen PAH-dion (*Harris, 2000*). Eftersom ämnet är reaktivt lösligt skall denna produkt undvikas att distribueras till t ex recipienter med råvatten.

Det är önskvärt att vidare undersöka optima för de faktorer som styr svampars val att oxidera PAH. En lista på ca 40 olika bakterietyper och 30 olika svampar (inklusive jästsvampar), vilka används och har använts vid biologisk sanering, redovisas i *OECD (1994)*.



#### 6.3.4. Biotillgänglighet

För att kunna bryta ner PAH måste PAH:et vara tillgängligt för mikroorganismerna. Detta kan undersökas på en rad olika sätt varav ett par beskrivs nedan. Biotillgängligheten av PAH kan bland annat undersökas med hjälp av persulfatoxidation. Metoden enligt *Cuypers m. fl. (1999)*, bygger på en selektiv kemisk oxidation av det organiska materialet med persulfat ( $S_2O_8^{2-}$ ). Vid uppvärmning bryts persulfaten ner och bildar sulfatradikaler ( $SO_4^{\bullet-}$ ), vilka kan reagera med organiskt material i en komplex oxidationskedja (*Kislenko m. fl., 1996*). De bästa resultaten erhöles vid en temperature på 70°C en oxidationstid på tre timmar och ett förhållande mellan persulfat och organiskt material på 12 g  $S_2O_8^{2-}$ /g organiskt material (*Cuypers m. fl., 1999*). Den höga oxidationstemperaturen kan vara en felkälla eftersom det har visats att temperaturer på över 65°C kan signifikant öka biotillgängligheten på PAH, troligtvis på grund av en ändring i strukturen hos det organiska materialet. Det är tänkbart att den här ändringen även sker under persulfat oxidationen och därmed ger en överskattning av biotillgängliga PAH:er.

Resultaten från *Cuypers m. fl. (1999)* visar på en mycket god överensstämmelse mellan biodegraderade och persulfatoxiderade PAH:er. Båda metoderna visar också att PAH:er blir mer svårnedbrytbara när ringantalet ökar, vilket stämmer väl överrens med övrig litteratur (ex. *Cerniglia 1992; Haeseler m. fl., 1999*). Att tänka på i den här metoden är att den ger information om biotillgängligheten, men inte om toxiciteten vilket gör att metoden på starkt kontaminerade områden kan visa en hög biotillgänglighet som dock inte kan utnyttjas, eftersom miljön är toxisk för mikroorganismerna. Ett annat sätt att snabbt få fram biotillgängligheten av PAH:er är att göra en extraktion med ett organiskt lösningsmedel, en svårighet i denna metod är att välja ett lösningsmedel som motsvarar biotillgängligheten. *Kelsey m. fl. (1997)* skriver att metoden har stor potential, men att det återstår en del forskning.

*Weissenfels m. fl. (1992)* undersökte nedbrytningen av PAH i två olika typer av jordar, A och B, under optimala betingelser i labbskala. Jord A, vilken bestod av en sandig struktur, togs från en gammal träimpregneringsanläggning. Jord B, som var tagen från ett gammalt tjäroljeraffineri-område, var heterogen i sin struktur och innehöll högre andel tyngre PAH än A. Andel PAH-nedbrytande bakterier i A var betydligt högre än i B och tester visade att orsaken inte var någon toxisk effekt från jord B. Då jord B blandades ut med sand ökade nedbrytningsgraden markant av främst fåringade PAH. Man ansåg att detta var en indikation på att den tidigare låga nedbrytningsgraden av PAH i B, i hög utsträckning berodde på dålig biotillgänglighet av PAH (d v s på det sätt som PAH var bundet till jord B).

Man undersökte vidare hur adsorption av antracen till olika medier påverkar dess nedbrytning. Jord A, jord B och en PAH adsorbent (XAD 2, amberlit-jonbytare, påverkar inte negativt tillväxten av PAH nedbrytare), inkuberades med bakterier och därtill tillsattes antracen. Efter 7 dagar erhöles en fullständig nedbrytning av antracen i jord A. Betydligt sämre nedbrytning erhöles i B. Efter 28 dagar återstod 23 % av tillsatt antacenolja i jord B. I provet med PAH adsorbent (XAD 2) erhöles ingen antracen nedbrytning alls.

Man fann vidare att adsorptionen av antracen till jord B kunde delas upp i två distinkta, kinetiska, processer. Initialt erhöles en snabb adsorption under en kort tid (1-2 timmar), med en efterföljande, långsam, adsorptionsprocess över en längre tid. Man föreslog att den första processen bestod av adsorption till hydrofoba ytor, medan den långsammare bestod av adsorption till områden inne i jordmatrisen. Den andel av förorening som på detta vis inkorporerats i jordmatrisen,

ansågs representera den del av förorening som inte var biotillgänglig och därför inte bionedbrytbar.

Bakteriell nedbrytning av PAHer anses i princip gå långsammare ju fler ringar som PAHerna består av. Man har dock funnit bevis på att PAHer med minst upp till fem ringar (eventuellt även 6-ringade) kan brytas ned mikrobiellt med mätbar hastighet (*Wild och Jones, 1993; Mahaffey m. fl., 1988; Keck m. fl., 1989; Cerneglia, 1984*). En av de viktigare orsakerna till att PAH bryts ned i allt långsammare takt ju fler ringar PAH består av anses främst vara deras ökande hydrofoba egenskaper. Eftersom bakterier består till stor del av vatten måste PAHerna kunna transporteras i vatten. Tillgängligheten av PAHerna är då bl a en funktion av deras löslighet.

Det finns bakterier (både aeroba och anaeroba) som försöker överkomma problem med låg tillgänglighet av hydrofoba kolväten genom att producera "tvättmedel", dvs bio-ytaktiva ämnen (se t ex *Rosenberg, 1986; Goswami och Singh, 1991; Yakimov m. fl., 1995*) i avsikt att lösa ut kolvätena, t ex tyngre PAH, i vattenfasen för bättre transport in i cellen (även vissa svampar producerar sådana ämnen). Ett alternativt eller kompletterande sätt är att mikroorganismerna gör hydrofoba ämnen mer hydrofila. Vissa bakterier och även svampar producerar härför extracellulära enzym som initialt oxiderar PAHerna utanför cellen och därmed gör dem mer vattenlösliga/tillgängliga.

Det är inte ovanligt att ett område som varit förorenat en längre tid, t ex av kreosot, innehåller bakterier som anpassat sig till denna omgivning till den grad att de för sin överlevnad producerar ytaktiva ämnen. Dessa bakterier och deras ytaktiva ämnen kan i vissa fall anses vara platsspecifika (de fungerar bäst under just de specifika förhållanden som föreligger i området) och därmed bör de anses som mycket värdefulla att stimulera och använda vid en sanering. I vissa fall har enbart biologiskt producerade ytaktiva ämnen tillförts *in situ*. I det sistnämnda fallen har varierande saneringseffektivitet erhållits. Som exempel på härav förbättrad reningseffektivitet (kortare reningstid), se *Noordman m. fl. (1997)*. Då det gått mindre bra har orsaken bl a berott på att dessa ämnen visat sig adsorberats allt för mycket till jorden. Även syntetiskt ytaktiva ämnen har använts vid sanering. Tanken har här varit densamma, dvs att öka lösligheten och tillgängligheten av starkt hydrofoba föroreningar. Även här har varierande resultat uppnåtts (*Laha och Luthy., 1991; Willumsen och Arvin, 1999; Churchill m. fl., 1995*). På senare tid har man börjat försöka att även använda bio-skum (*Ripley m. fl. 2000; Kayser m. fl., 1997*). Ytterligare information om bioproducerade och syntetiskt framtagna ytaktiva ämnen kan erhållas i *Banat (1995)*.

Eftersom nedbrytning av PAHer kan kräva bakterier med enzym som är specialanpassade till PAH-strukturerna (och därtill produktion av platsspecifika ytaktiva ämnen om sådana organismer finns i området, se ovan) är det generellt sett betydelsefullt att främst stimulera de platsspecifika PAH-nedbrytarna. Exempelvis, *Grosser m. fl. (1991)* visade att mineralisering av tyngre PAH kunde ökas markant då speciellt utvalda bakterier, tagna från det förorenade materialet, efter uppodling återinsattes till det förorenade materialet. 55 %-ig nedbrytning av pyren erhöles efter 2 dagar, med hjälp av uppodlad *Mycobacterium* sp., jämfört med 1 % utan tillsats. Denna typ av bakterie har visat sig vara god mineraliserare av tyngre PAH.

## 6.4. Klorerade alifater

### 6.4.1. Inledning

Detta kapitel behandlar främst klorerade alifater och erfarenheter, publicerade fram till och med 2000, avseende reduktion av dessa i jord och vatten genom främst biologisk nedbrytning.

Av de halogenerade kolvätena är produktion, användning och spridning av de klorerade kolvätena volymmässigt störst. Större delen av de halogenerade kolväten som förorenat mark och vatten är sannolikt klorbaserade. Som exempel kan nämnas klorerade alifatiska lösningsmedel, klorerade fenoler, klorerade bensener och polyklorerade bifenyler. Därutöver förekommer freoner, innehållande både fluor och klor, och till mindre del kolväten med både brom och klor, eller enbart brom, i molekylen. De senare används bl a som drivgaser, pesticider, desinfektionsmedel och flamskyddsmedel.

Enligt Naturvårdsverkets branschkartläggning 1995, (*SNV Rapport 4393, 1995*) fanns fler områden i Sverige som var förorenade med klorerade kolväten än förorenade med PAH'er, men färre än petroleumförorenade områden. Hur stor andel av dessa klorerade kolväten som var klorerade alifater har inte gått att utröna. Antalet områden i Sverige förorenade med klorerade alifater får ändå antas vara betydande. Enligt en relativt ny studie i USA (*Knox m. fl., 1996*) var perkloretylen (perkloreten, PCE) den tionde vanligast förekommande föroreningen i USAs grundvatten och hänfördes till den näst mest angelägna gruppen att åtgärda, baserat på dess förekomst i grundvattnet och negativa hälsoeffekt. PCE är en flyktig och giftig klorerad alifat som i stor utsträckning har används inom kemtvättindustrin, men även för allmän rengöring och avfettning inom industrin och militären. Det är inte enbart PCE som är giftig. Alla klorerade alifater är i princip toxiska och ett flertal är misstänkta human-cancerogener (trikloretylen, vinylklorid etc).

Klorerade alifater med maximalt två kolatomer var bland de mest förekommande organiska föroreningar som under 1980-talet uppdagades i amerikanska markområden. Bland dessa fanns, förutom PCE, även bl a trikloreten och 1,1,1-trikloreten, vilka använts industriellt i stor skala för kemtvättning, avfettning och som lösningsmedel (*Henson m. fl., 1988*). Vinylklorid, som används till produktion av PVC-plast, har dock hittats i naturen i relativt liten skala (*Broholm m. fl., 1991; Henson m. fl., 1988; Notiser, 1994; Holliger, 1992*). Tabell 6.4.1 ger en uppskattad världsproduktion av de tio mest producerade klorerade alifaterna under 80-talet.

Ett av resultaten av denna stora användning av klorerade alifater har blivit omfattande förorening, inte minst i grundvatten. Klorerade alifaters negativa hälsoeffekter, tillsammans med deras varierande bionedbrytbarhet, har resulterat i krav på omedelbar sanering vid upptäckta spill. Tidigare har främst kemiska/fysikaliska metoder, som att pumpa och rena kopplat till adsorption på aktivt kol eller luftning i packade bäddar, använts för att reducera halter av dessa ämnen i vatten. Emellertid destrueras inte de klorerade kolvätena med dessa metoder utan överförs istället från vätskefas till fast- eller gasfas. För förorenad jord har framför att uppgrävning och deponering varit den gängse metoden. Under senare tid har dock mikrobiella metoder börjat användas för sanering av klorerade kolväten. Sådana metoder kan ofta erbjuda ett miljömässigt sundare och attraktivare alternativ. Främst beror detta på att dessa ämnen optimalt kan brytas ned till miljömässigt acceptabla restprodukter som koldioxid, saltsyra och vatten.

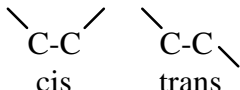
Tabell 6.4.1. Uppskattad årlig världsproduktion under 1980-talet av de 10 mest producerade klorerade alifatiska kolvätena (Chem.&Eng. News 1991, 69: 28-74).

Ämne	Världsproduktion; 10 <sup>6</sup> ton/år	Produkt/applikation
1,2-Dikloreten (DCE)	23,0	vinylklorid/polyvinylklorid
Vinylklorid (VC)	18,5	polyvinylklorid
Tetrakloreten (perkloreten) (PCE)	1,2	kemtvätt/lösningsmedel
Triklloreten (TCE)	1,0	kemtvätt/lösningsmedel
Tetraklormetan (CT)	1,0	syntetiskt gummi
Triklormetan (CF)	0,9	intermediär i synteser
1,1,1-Trikloretan (TCA)	0,8	lösningsmedel
Epiklorhydrin (3-klorepoxypropan) (EPI)	0,7	intermediär i synteser
Diklormetan (DCM)	0,6	lösningsmedel
Klormetan (metylklorid) (CM)	0,5	lösningsmedel

#### 6.4.2. Kemisk struktur och egenskaper

Sifferbeteckningar, prefix, framför namnet på klorerade alifater betecknar på vilken/vilka kolatom/-er kloreten/kloren sitter, enligt Tabell 6.4.2. Exempelvis har 1,1-dikloreten två kloratomer på en och samma kolatom, medan 1,2-dikloreten har en kloratom på vardera kolatom. I de fall prefixen inte klarlägger hur molekylens stereokemiskt ser ut, kan strukturen klarläggas genom att placera beteckningarna *cis* eller *trans* framför namnet eller nummer prefixet (Tabell 6.4.2).

Tabell 6.4.2. Beteckning av kolatom för några alifater och definition av *cis*-, *trans*-bindning.

Benämning, stomme	Metan	Etan	Eten	Propan	Propen
Kolbeteckning	1	1 2	1 2	1 2 3	1 2 3
Kolstomme	C	C-C	C=C	C-C-C	C=C-C
Max klor	4	6	4	8	6
Exempel	CHCl <sub>3</sub>	HCl <sub>2</sub> C- CClH <sub>2</sub>	HCIC-CCIH	H <sub>2</sub> CIC-H <sub>2</sub> C- HCl <sub>2</sub> C	HCIC=CH- CHCl <sub>2</sub>
Benämning (av exemplet)	Triklor- Metan	1,1,2- trikloreten	Cis- eller trans- dikloreten	1,3,3- triklorpropan	1,3,3- triklorpropen
Cis- och trans- struktur					

Tabell 6.4.3. Förkortningar av några klorerade alifater.

Klorerad alifat	Förkortning	Klorerad alifat	Förkortning
Klormetan, metylklorid	CM	Kloreten, vinylklorid, monokloreten	VC
Diklormetan (metylenklorid)	DCM	Dikloreten	DCE
Triklormetan, kloroform	CF	Triklloreten (trikloretylen)	TCE
Tetraklormetan, koltetraklorid	CT	Tetrakloreten, perkloreten	PCE
Kloreten, monokloreten	CA	Triklorpropan	TCPA
Dikloreten	DCA	Klorpropen	CPE
Triklloreten	TCA	Diklorpropen	DCPE
Hexakloreten	HCA		

För att underlätta benämningen av klorerade kolväten kommer förkortningar, definierade i Tabell 6.4.3, att användas.

Tabell 6.4.4 ger några kemiska/fysikaliska konstanter för DCM, TCA, TCE och PCE. Härav framgår bl a att klorerade alifater i allmänhet är betydligt tyngre än vatten, resulterande i att man kan finna dessa i undre delen av grundvattenzonen (i sänkor etc) och/eller på underliggande impermeabla material (berg etc). Lösligheten i vatten varierar stort från ämne till ämne och avspeglar vilket/vilka ämnen som i vissa fall kan detekteras i mycket höga koncentrationer i grundvattenzonen nedströms utsläppspunkten.

Tabell 6.4.4. Några klorerade alifaters kemiska/fysikaliska konstanter (Broholm m. fl., 1991; Verschueren, 1983).

Kemiska/fysikaliska konstanter	DCM	TCA	TCE	PCE
Molvikt (gram/mol)	85	133	132	166
Densitet (kg/l)	1,33	1,34	1,46	1,62
Löslighet (mg/l; 20 °C)	Ca 2•10 <sup>4</sup>	Ca 7•10 <sup>2</sup>	Ca 1•10 <sup>3</sup>	Ca 1,4•10 <sup>2</sup>
Log Kow (-)		2,49	2,29	2,60
Henrys konstant (-; 10 °C)	0,12 <sup>a</sup>	0,34	0,17	0,31

<sup>a</sup>: Experimentellt vid 25 °C

### 6.4.3. Biologisk nedbrytning

Nedbrytning på biologisk väg sker i allmänhet med hjälp av enzymer, som främst finns inne i mikroorganismernas celler. För att försöka att på något enkelt sätt åskådliggöra faktorer kring sådan, egentlig komplex, nedbrytning ges inledningsvis en grovt förenklad, och delvis hypotetiserad, betraktelse. Enzymerna agerar som katalysatorer, dvs de sänker reaktionsenergin så att reaktionerna, dvs nedbrytningen av förorening, kan ske vid betydligt lägre temperaturer, än om samma reaktioner skulle ske med enbart värmeenergi. I de fall enzymet/enzymen finns inne i mikroorganismens cell, måste föroreningen transporteras i vattenfasen utifrån, genom cellens yttre delar och in i cellen. Därtill måste det finnas bl a enzym i cellen närvarande för att föroreningen skall kunna brytas ned. I vissa fall finns inga enzym närvarande (eller för lite aktiva enzym) om det inte finns förorening (ur mikroorganismens synvinkel "föda"). Mycket förenklat kan man säga att föroreningen i dessa fall troligtvis måste aktivera vissa receptorer bl a på cellens yttre del (finns troligtvis även inne i cellen). Härav stimuleras sändning av signaler in i cellen (till bl a centralt för enzymproduktion). Signalerna kan innehålla meddelandet t ex att nu finns det mat så öppna porten (för transport av maten genom cellens yttre del) och/eller starta produktion av (eller i vissa fall öka eller fortsatt producera) enzym för just den förorening som finns utanför (eller ev. inne i) cellen. Detta kan sägas vara en form av "inducering", dvs enzymproduktionen induceras av att mat, i våra ögon ibland förorening, finns närvarande.

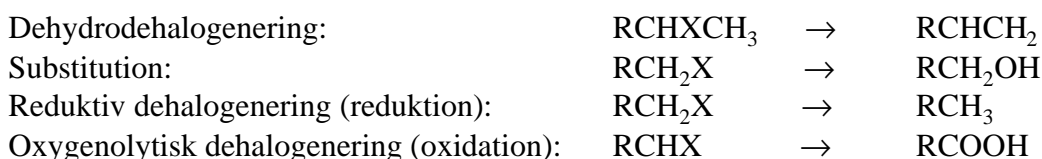
I vissa fall finns dock vissa enzym alltid närvarande, oavsett förekomst av mat eller inte (gäller dock i allmänhet inte enzym som bryter ned klorerade kolväten). När det gäller klorerade alifater är det i allmänhet så att dessa ämnen inte betraktas, dvs inte kan användas, av mikroorganismen som föda (allt fler undantag börjar dock dyka upp, se nedan). Däremot kan det finnas enzymer i dess cell som kan bryta ned klorerade alifater, men som egentligen är designade av mikroorganismen för att bryta ned föda istället. Födan kan i det här fallet vara t ex kolväten (alltså icke-klorerade sådana) av olika slag. Mikroorganismen vinner ingen energi på att bryta ned det klorerade kolväta och detta kallas då co-metabolism, se vidare nedan. Det intrikata är då att stimulera

nedbrytning av det klorerade kolvätet, samtidigt som organismen inte tillåts inrikta sig allt för mycket på födan. Just detta är en av de viktigaste orsakerna till varför man nu i ökad utsträckning tillför organiska ämnen i pulser till klorerade alifat förorenade områden in situ (se om pulsering i 5.3.1 och i 6.4.3.2).

För nedbrytningen behöver mikroorganismerna även sk elektronacceptorer, t ex syre. Dessa är ämnen som slutligen tar hand om de elektroner som bildats under nedbrytningsprocesserna. Beror på bl a antalet kloratomer per kolatom i en klorerad alifat kan den antingen oxideras eller reduceras. Klorat uppvisar starkare oxidativ effekt än syre och ju mer klor det finns på varje kol desto svårare för syre att oxidera kolet på vilket kloren sitter. Alltså, ju fler klor på kolvätet desto starkare blir det klorerade kolvätets elektronmottagande förmåga, med minskad oxidationsbenägenhet som följd. Exempelvis är alifaterna hexakloretan och perkloreten (kolväten med många kloratomer per kolatom) starkare elektronacceptorer än syre. Dessa går då i inte att attackera med oxidationsenzym. Mikrobiell nedbrytning av dessa under syrerika (aeroba) förhållanden ske därför normalt inte. Istället kan de då brytas ned under anaeroba förhållanden (se under anaerob nedbrytning, nedan).

Förenklat kan sägas att klorerade alifater med 1-2 kloratomer tenderar att brytas ned aerobt. Klorerade alifater med 4 eller fler kloratomer tenderar att brytas ned anaerobt, medan med 3 kloratomer kan bytas ned på båda sätten (*Cs-Umt-Edu, 2000*). Det finns dock undantag.

Halogenerade kolväten kan principiellt brytas ned på flera sätt genom borttagande av halogen från kolvätet enligt följande generella formler:



Nedan beskrivs mer ingående olika typer av angreppssätt/förhållanden, nödvändiga för att ovanstående principiella reaktioner skall kunna förverkligas vid nedbrytning av klorerade alifater.

#### 6.4.3.1. Anaerob nedbrytning

Anaerob nedbrytning av klorerade kolväten, dvs i frånvaro av syre, sker ibland på co-metabolisk väg och då av bl a bakterier av typen sulfat-reducerare, metanogener och acetogener. Co-metabolism innebär att det klorerade kolvätet transformeras av mikroorganismerna utan att energi eller kol genereras till egen celluppbyggnad från det klorerade kolvätet. Dessa co-metaboliska anaeroba processer liknar aeroba dito i det att elektronacceptorer andra än det klorerade kolvätet utnyttjas (t ex sulfat) av enzym som händelsevis bryter ned det klorerade kolvätet (enzymets primära aktivitet är alltså metabolisk, dvs att bryta ned ämnen som kan användas att bygga upp cellen). Längre ansåg man att mikroorganismer inte kunde utnyttja klorerade alifater som föda. Nyligen har man emellertid funnit undantag; dvs olika bakteriegrupper som, i motsats till co-metaboliska processer, kan nyttiggöra sig av nedbrytning av klorerade kolväten i form av generering av cellenergi eller kolkälla, sk dehalorespiration, se nedan. I dessa fall används det klorerade kolvätet som slutlig elektronacceptor (*Cs-Umt-Edu, 2000*).

Av de ovan nämnda generella reaktionerna utförs följande reaktioner under anaeroba förhållanden.

**Dehydrodehalogenering** är i allmänhet en abiotisk eliminationsprocess som inte involverar extern elektronöverföring, dvs elektronacceptor/donator krävs inte vid denna reaktion. Enligt *Cs-Umt-Edu (2000)* är reaktionen inte en redoxprocess men ofta katalyserad av baser vid vilken ett väte och ett klor eliminerar från molekylerna. Exempelvis kan vinylklorid omvandlas till acetylen enligt  $\text{CH}_2=\text{CHCl} \rightarrow \text{CH}\equiv\text{CH} + \text{HCl}$  eller omvandling av 1,1,2,2-tetrakloreten till 1,1,2-trikloretylen enligt  $\text{Cl}_2\text{HC}-\text{CHCl}_2 \rightarrow \text{Cl}_2\text{C}=\text{CHCl} + \text{HCl}$ . Monoklorerade alifater anses inte dekloreras med denna metod och ju mer klor på varje kol desto större potential för snabbare reaktion (*Vogel m. fl., 1987*).

Som nämns ovan är reaktionen i allmänhet abiotisk (icke-biologisk). Det är därför inte så konstigt att endast ett fåtal rapporter har hittats som beskriver nämnda process som biologisk vid nedbrytning av klorerade kolväten (*Chen m. fl., 1996, Alexander, 1994*) och dess roll anses vara sällsynt vid mikrobiologisk nedbrytning av klorerade alifater (*Holliger, 1992*). Härav behandlas inte denna typ av reaktion vidare i denna rapport.

**Reduktiv dehalogenering** anses vara en universell dekloreringsmetod (alltså metod som avlägsnar klor från molekylerna) vid anaeroba förhållanden. Även klorerade aromater, inklusive PCB, har befunnits genomgå klorreduktion genom denna typ av mikrobiella process. Allt från järnreducerare till metanogener och acetogener tycks kunna utföra reaktiv dehalogenering (*Cs-Umt-Edu, 2000*). Då klorerade alifater (exklusive kloroform) bryts ned anaerobt kan i vissa fall vinylklorid bildas som intermediär under nedbrytningsprocessen. Detta gäller främst då ursprungsmolekylerna är en klorerad eten (omättat klorerad alifat).

Reduktiv dehalogenering anses kunna utföras både co-metaboliskt och metaboliskt (*Cs-Umt-Edu, 2000*). Det senare är en form av reaktiv dehalogenering som nyligen har upptäckts och benämns **dehalorespiration**. Om halogenen är klor kallas reaktionen deklorrespiration. Vid denna process erhålls cellenergi eller kolkälla från den anaeroba nedbrytningen av klorerat kolväte. Deklorrespiration har visat sig kunna bryta ned klorerade alifater, inklusive högklorerade alifater, mycket snabbare än alternativ co-metabolism. Det klorerade kolväta används som elektronacceptor och energi konserveras via elektrontransport-fosforylering, varvid en eller flera kloratomer byts ut mot väte i molekylerna (*Middeldorp m. fl., 1999; Hardy m. fl.; 1999*). PCE har visat sig kunna brytas ned på detta sätt med hjälp av bakterier, varav vissa innehåller dehalogenasenzym innehållande coenzymet vitamin B12 (*Diekert, 1999*). Exempel på sådana bakterier uppges vara *Dehalospirillum sp.*, *Desulfitobacterium sp.* och *Dehalobacter restrictus* (*Diekert, 1999; Pas, 2000*). Enzymsystemet som används av *Desulfitobacterium sp.* för den metaboliska nedbrytningen av klorerade kolväten anges vara inducerbart (*Pas, 2000*). Inducering innebär i detta fall att ämnet i sig kan trigga bakteriecellen att producera enzym som bryter ned ämnet. En annan anaerobt verkande bakterie, *Acetobacterium dehalogenans* (har isolerats), kan utnyttja metylklorid som enda energikälla (*Holliger m. fl., 1999*) (normalt är lågklorerade kolväten mindre lämpade för anaerob attack). Även här spelar vitamin B12 in. Först kopplas metylgruppen i molekylerna till tetrahydrofolat varefter metylgruppen oxideras via format till  $\text{CO}_2$ .

En bakterie, preliminärt kallad *Dehalococcoides ethenogenes* 195, kan metaboliskt använda vätgas som enda elektronkälla och klorerade kolväten (bl a PCE) som elektronacceptorer, med slutlig produktion av eten (*Zinder, 2000*). Man har även funnit att det lågklorerade kolväta 1,2-diklorpropan (DCP), via fermentering och i frånvaro av andra kolväten, kan generera vätgas till den metaboliska nedbrytningen av högklorerade kolväten, som PCE (*Hardy m. fl.; 1999*).

Reduktiv dehalogenering kan indelas i de fyra undergrupperna Dihalo-eliminering, Koppling, Hydrolytisk reduktion och Hydrogenolys, Figur 6.4.1. Som framgår av denna figur kräver, i mot-

sats till dehydrodehalogenering, reduktiv dehalogenering elektron -donator/-acceptor för att kunna genomföras.

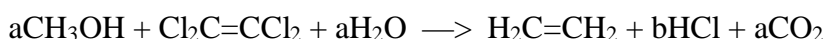
Vid *Dihalo-eliminering* (Figur 6.4.1) elimineras två halogener samtidigt med efterföljande bildning av dubbelbindning. Reaktionen sker med halogenerade cykliska och icke-cykliska alifater (cykliska alifater har i motsats till aromater, som också är cykliska, inga omättade dubbelbindningar i ringstrukturen) och är i det senare fallet begränsad till molekyler med mer än en kolatom. Under litteraturgenomgången har två alternativa typer av reaktionsmekanismer hittats (Figur 6.4.1). Det har inte gått att fastställa om en av dessa är ogiltig eller om båda är realistiska. I fallet med produktion av klorgas ( $X_2$ ) beskriver *Cs-Umt-Edu (2000)* att ingen ännu har bevisat varför bakterier skulle producera klor. Man anser att kloreten hypotetiskt kan produceras i försvarssyfte, på samma sätt som många svampar och actinomycetes producerar antibiotika som kemiskt försvar och som däggdjurs immunsystem producerar hypoklorsyra i bakteriedödande syfte. Enligt *Cs-Umt-Edu (2000)* anses reaktionen bli kunna ske med 1,1,2,2-tetrakloreten till cis- och trans-1,2-dikloreten eller 1,1,2-trikloreten till vinylklorid; i båda fallen med samtidig produktion av klorgas.

*Koppling* (Figur 6.4.1) kan ske när fria radikaler föreligger och har endast iakttagits generera sidoprodukter (här bildas molekyler med fler kolatomer än ursprungsmolekylerna, dvs i princip inge nedbrytningsreaktion).

*Hydrolytisk reduktion* (Figur 6.4.1) innebär att det klorerade kolvätet initialt överförs till en radikal (två-elektron-reduktion till karbenoid radikal) som i sin tur hydrolyseras av vatten, varvid det ursprungliga kolvätet eller kolet erhåller vattnets syre eller hydroxylgrupp, resulterande i oxidation till  $R=O$  eller  $HROOH$  (där R är kol eller kolkedja). Denna typ av reaktion skulle kunna förklara produktion av  $CO_2$  vid anaerob reduktion av t ex högklorerat tetraklorometan eller bildandet av acetat vid nedbrytning av 1,1,1-trikloreten (*Holliger, 1992*). Observera att det är främst första delen av beskriven reaktionsgång som utförs under anaeroba förhållanden. Den efterföljande hydrolysen kan utföras under både anaeroba och aeroba förhållanden (en variant av hydrolys är substitutionsreaktion där klor direkt byts ut mot t ex hydroxyljon, se Substitution under Aerob nedbrytning nedan).

I de fall syreunderskott föreligger kan mikroorganismer ibland ändå oxidera ämnen (som dock i detta fall alltså först attackerats anaerobt) genom att använda, i vattenmolekylen ingående, hydroxylgrupp. Reaktionerna, som ibland även kallas hydrolytisk dehalogenering eller enbart hydrolys, kan utföras av enzymer benämnda hydrolaser. Ur kemisk synvinkel är processen principiellt anaerob, eftersom inget molekylärt syre deltagar. Reaktionerna kan dock utföras av både aeroba och anaeroba mikroorganismer och kan ibland vara kopplade till oxygena reaktioner.

Intressant att notera är att en variant av denna typ av reaktion har angetts att i vissa fall kunna vara av formen dehalorespiration och då förlöpa anaerobt enligt (som exempel på elektrondonator anges här metanol) (*Schaffner m. fl., 1999*):

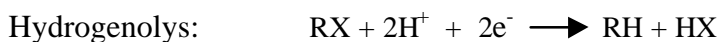
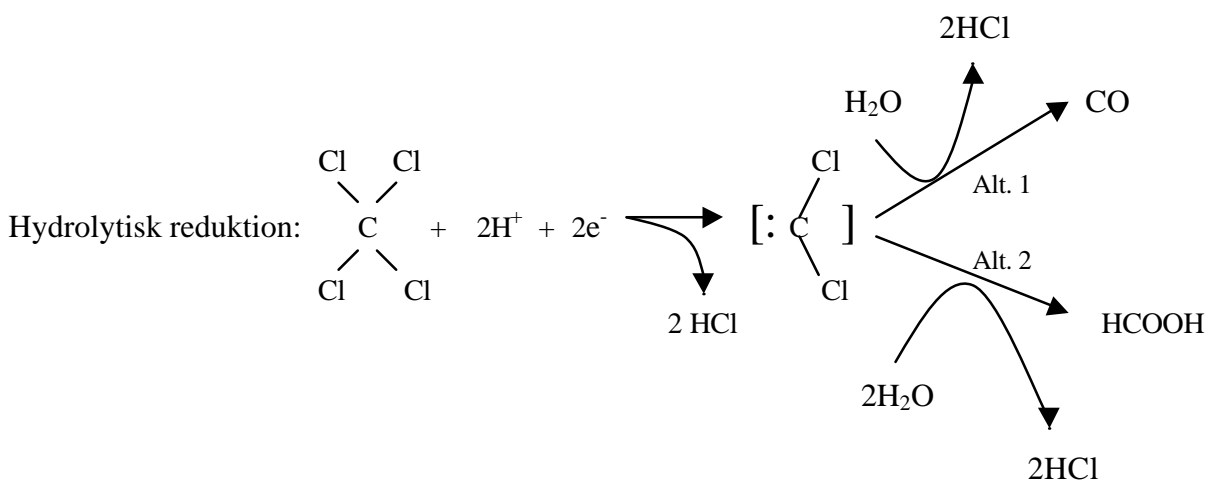
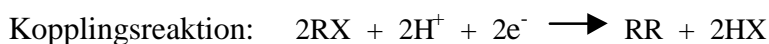
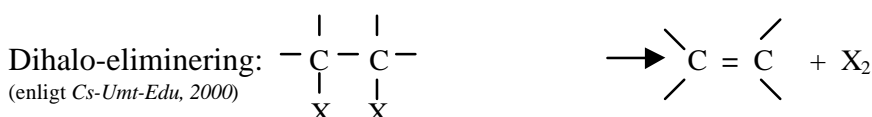
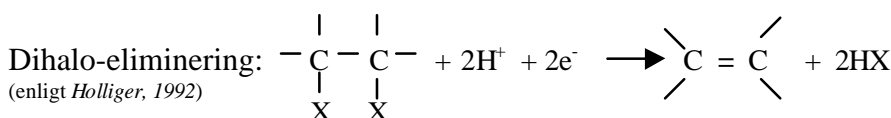


*Hydrogenolys* (Figur 6.4.1) anses vara den vanligaste reduktiva dehalogeneringsreaktionen och kan ske med både klorerade alifater och aromater. Polyklorerade alifater beter sig ofta som elektronnottagare och tenderar därför att under anaeroba förhållanden genomgå sekventiell hydrogenolys. Sådan reduktiv deklorering kan generellt beskrivas enligt följande (i det här fallet tetrakloreten deklorering): tetrakloreten ( $C_2Cl_4$ )  $\longrightarrow$  trikloreten ( $C_2HCl_3$ )  $\longrightarrow$  dikloreten ( $C_2H_2Cl_2$ )



—> vinylklorid (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>Cl) —> eten (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (*Leahy och Brown, 1994*). Även denna typ av reduktiv dehalogenering kan ibland vara av formen dehalorespiration (*Cs-Umt-Edu, 2000*).

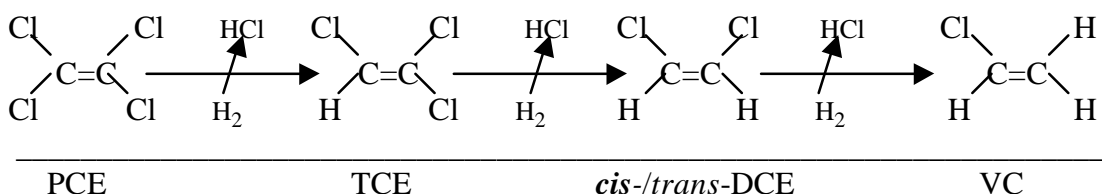
Ett flertal rapporter har publicerats angående anaerob reduktiv dehalogenering av klorerade alifater (reduktiv deklorering). Rapporterna behandlar främst högklorerade kolväten som tetrakloreten (PCE) och tetra-, (penta-) och hexakloreten och med reaktionsförloppet hydrogenolys. Dekloreringshastigheten har visat sig vara högre ju högre andel klor molekylens besitter, men tyvärr, som nämnts ovan, i vissa fall med produktion av besvärliga mellanprodukter som vinylklorid (*Broholm m. fl., 1991*). Anaerob nedbrytning av klorerade alifater kan alltså ge mellanprodukter vilka ur hälsosynpunkt kan vara farligare och mer flyktiga än ursprungssämnet.



Figur 6.4.1. Schematisk beskrivning av olika typer av reduktiva dehalogenerings-reaktioner (*Holliger, 1992*). Den alternativa dihalo-eliminerings-reaktionen enligt *Cs-Umt-Edu, (2000)*.

Metanogena, och ibland även sulfatreducerande och nitatreducerande, bakterier har visat sig ha god kapacitet att bryta ned PCE under anaeroba förhållanden. Detta har visats i jord (*Kleopfer m. fl., 1985*), i organiskt sediment (*Parsons m. fl., 1984; 1985; Parsons och Barrio-Lage m. fl., 1985*), som ren kultur (*Fathepure m. fl., 1987; Fathepure och Boyd, 1988a; 1988b*) och i biore-

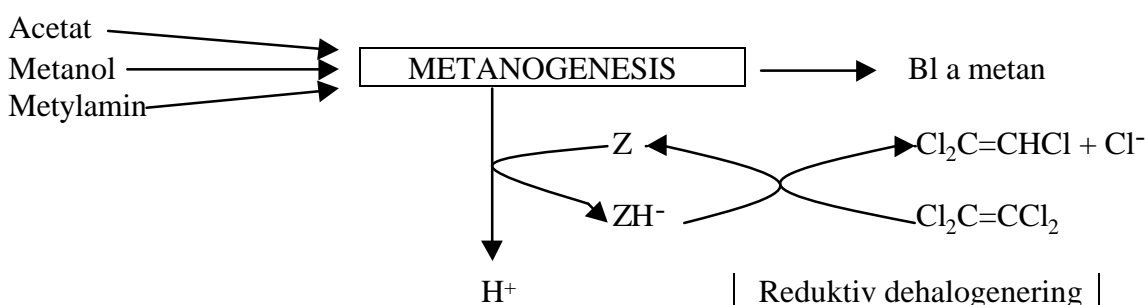
aktorer (*Bouwer och McCarty, 1983a; 1983b; Bouwer och Wright, 1988; Vogel och McCarty, 1985; 1987*). Nedbrytningen har framför allt befunnits ske sekventiellt till trikloreten (TCE), dikloreten-isomerer (trans-dikloreten, cis-dikloreten), vinylklorid och eten (*Freedman och Gossett, 1989*) genom hydrogenolys. Processen för hydrogenolys av PCE och dess intermediärer kan principiellt beskrivas enligt Figur 6.4.2. Det kan nämnas att man funnit att intermediären *cis*-DCE företrädesvis (dvs betydligt över 50 % men ej 100 %) bildas under metanogen reductiv dehalogenering av TCE (*INET, 1993; Chu och Jewell 1994*).



Figur 6.4.2. Reduktiv anaerob deklorering (*Hardman, 1991*) i form av hydrogenolys.

Enligt beskrivningen i bl a Figur 6.4.1 måste vätejoner ( $2\text{H}^+$ ) och elektroner ( $2\text{e}^-$ ) föreligga för att reductiv dehalogenering skall kunna äga rum. Detta innebär att sådan mikrobiell deklorering inte kan ske utan parallell generering av vätejoner och elektroner. Dessa kan erhållas från t ex ren vätgas eller från nedbrytning av kolväten. Systemet kräver alltså att det sker andra mikrobiella reaktioner som samspelar med den mikrobiella reductiva dekloreringen. Vid parallell nedbrytning av kol- och väterika föreningar erhålls bl a detta väte och nödvändiga elektroner för utförandet av reductiv deklorering, resulterande i slutprodukten metan från de kol-/väte rika föreningarna och reduktion av antal klor på det klorerade kolvätet (varvid även saltsyra, HCl, bildas). De nödvändiga elektronerna (och vätet) till denna typ av reaktion kan härvid produceras genom bl a metanogenesis (Figur 6.4.3) eller acetogenesis (Figur 6.4.4).

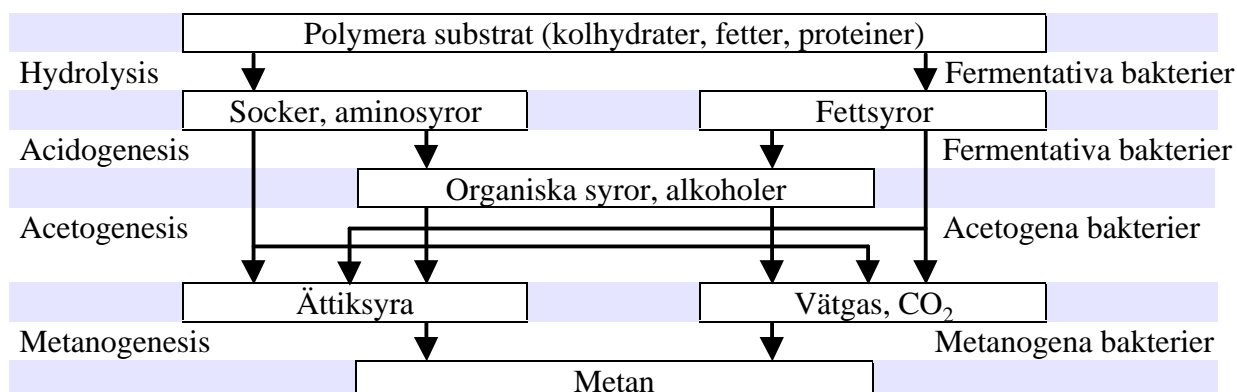
Vad gäller metanogena bakterier konsumerar de flesta vätgas för produktion av metan. Emellertid utnyttjar vissa metanogener t ex acetat eller metanol för tillväxt och dessa kan co-metabolisera klorerade kolväten med upp till två kolatomer (*Hardman, 1991*). Detta innebär att flera olika typer av mikrobiella reaktioner (dvs både elektron-/väte produktion och nedbrytning av klorerat kolväte) måste utföras av samma mikroorganism, eller att flera olika mikroorganismer specialiserade på olika nedbrytningsreaktioner samspelar. Häri ligger en av de avgörande faktorer som måste realiseras för lyckad anaerob nedbrytning av klorerade kolväten.



Figur 6.4.3. Exempel på samspelande anaeroba reaktioner: t ex metanogenesis och reductiv dehalogenering (*Hardman, 1991*).

Även vid acetogenesis produceras väte som kan användas vid anaerob deklorering. De ämnen som bryts ned under acetogenesis, exempelvis enkla organiska syror och alkoholer, kan till exempel ha producerats vid fermentering, Figur 6.4.4. Fermentation inbegriper ATP-produktion som resultat av oxidation av ett substrat och reduktion av ett annat.

Vid nedbrytning av metabolisk kolkälla av den typ som ges i Figur 6.4.3 och 6.4.4 produceras alltså väte (metanogent, acetogent) som kan fungera som vätedonator i dekloreringsprocessen, samtidigt som elektroner frigörs till samma process. Det producerade vätet kan dock även utnyttjas av t ex fermenteringsorganismer eller metanogener. Vid nedbrytning av klorerade kolväten där processen endast baseras på naturligt producerad vätgas (alltså ingen aktiv tillsatts av ren vätgas) krävs därför relativt stora mängder metabolisk kolkälla (som vätekälla) för den parallella anaeroba reductiva dehalogeneringen. Detta alltså eftersom en betydande del av genererat väte används i andra parallellt pågående reaktioner som inte är kopplad till dekloreringen. Enligt *Bouwer (1994)* kan dessa reaktioner kräva ett förhållande mellan primärt substrat (elektron-donator) och klorerat kolväte av 100/1 upp till 1 000/1. För att till del avhjälpa detta kan vätgas direkt tillföras (*Carr och Hughes, 1998*).



Figur 6.4.4. Anaeroba reaktioner med organiskt material. (Ad hoc, 1994)/Siemens AG, Ger.)

Av central betydelse är att välja sådan elektron-/väte-källa och koncentration av densamma som upprätthåller god dekloreringsaktivitet utan att de organismer som utnyttjar vätet i t ex fermentationsprocesserna tar alltför mycket av producerat, eller externt tillfört, väte. I vissa fall har indikationer på detta erhållits, dvs att koncentrationen (partialtrycket) av vätgas inte får bli för högt; annars kan fermenteringsorganismerna utkonkurrera deklorerarna (*Ballapragada m. fl., 1997; deBruin m. fl., 1992*); i andra fall inte (*Carr och Hughes, 1998*). *Smatlak m. fl. (1996)* har funnit indikationer på att det till och med skulle vara till fördel för deklorerarna om koncentrationen av vätgas sänktes till betydligt under (ned till 2nM) vad som normalt krävs för de väte-konkurrerande metanogenerna (23-75 nM) (jämför/se vidare under kapitel 5.3 och där sammanfattning av referensen Fennell och Gossett, 1999).

Vidare spelar det klorerade kolvätet rollen som elektronacceptor i konkurrens med andra eventuellt befintliga elektronacceptorer. När redoxpotentialen har blivit så låg att denna motsvarar vad som krävs för sulfatreduktion, kan de flesta klorerade kolväten börja att termodynamiskt konkurrera om elektronerna med sulfat (*Moutoux m. fl., 1997*). Lågklorerade alifater, t ex VC, kan dock brytas ned anaerobt under högre redoxpotential, t ex vid järnreducerande förhållanden (*Bradley och Chapelle, 1996*).

Som nämnts ovan är det mest vanliga anaeroba angreppssättet reduktiv dehalogenering genom hydrogenolys. Med denna typ av reaktion kan molekylerna inte fullständigt mineraliseras till koldioxid, vatten och saltsyra. Men som framgår av Figur 6.4.1, och som nämnts ovan, finns möjligheter att en delvis mineralisering kan ske till koldioxid under anaeroba förhållanden via hydrolytisk reduktion, som också är en typ av reduktiv dehalogenering. Vid denna reaktion bildas bl a aldehyder och CO som vidare kan oxideras till karboxylsyror och CO<sub>2</sub>. Även om flera publikationer föreligger om att CO<sub>2</sub> producerats på detta och andra anaeroba sätt (enligt Holliger, 1992, som refererar till *Cridde, 1989; Egli m. fl., 1990; Egli m. fl., 1988; Galli och McCarty, 1989*), synes dessa reaktioner dock vara betydligt mindre vanliga än hydrogenolys, vilken alltså enbart minskar antalet klor på molekylen. För fullständig mineralisering krävs i det senare fallet att de anaerobt deklorerade kolvätena efter-attackeras av aeroba mikroorganismer (se nedan avsnitt "Aerob nedbrytning") för att fullständigt mineraliseras.

Ett stort antal publikationer finns avseende anaerob deklorering av klorerade metaner, etaner och etener. Som exempel kan nämnas laboratorieförsök genomförda av *Chu och Jewell (1994)*. De visade att en mer än 98 %-ig reduktion av PCE kunde erhållas i en fix-film reaktor vid 35 °C. Inflödeskoncentrationen var då maximalt 26 mg PCE/l. Man fann indikationer på att dekloreringshastigheten av PCE, efter en aklimatiseringsperiod av 10 dagar, var en direkt funktion av den totala koncentrationen av biomassa och av koncentrationen av tillgänglig, lättnedbrytbar, kolkälla (sukros). Slutprodukterna bestod huvudsakligen av vinylklorid och en mindre mängd eten. 50 mg/l sukros krävdes för att avlägsna 1 mg/l PCE till under 0,01 mg/l, vilket emellertid gav en önskat stor mängd BOD (biological oxygen demand) som kontinuerligt måste avlägsnas. Kvarhållandet av erhållen god omsättningsgrad vid lägre temperatur och vid radikalt minskade mängder av BOD, ansågs vara en framtida utmaning. Framför allt gäller detta för att kunna utnyttja den anaeroba tekniken vid nedbrytning av PCE i större skala.

*DiStefano m. fl. (1991)* visade att vinylklorid, som anses vara starkt cancerogen och som hade bildats vid anaerob nedbrytning av ca 55 mg PCE/l, i hög grad kunde fortsätta att brytas ned anaerobt till eten (80 % reduktion). Man fann att den använda blandade bakteriekulturen inte utnyttjade metanogenesis (halten av PCE och/eller dess intermediärer var för höga för den typen av process), fastän metanol hade tillsatts. Man fann dock att metanogenesis initialt förekom, men då halten av PCE höjdes förändrades bakteriekulturen. Indikationer erhöles att bakterier med andra reaktionssätt vid det här stadiet orsakade nedbrytning ned PCE, och man föreslog att den huvudsakliga reaktionsvägen var acetogenesis. Acetogenesis innebär att mikroorganismer använder kolmonoxid-acetyl coenzym A och varianter härav, möjligtvis i samspel med metanogenesis.

Anaerob reduktiv deklorering av klorerade alifater kan generellt sägas resultera i slutprodukter som vinylklorid och/eller eten. Enligt *de Bruin m. fl. (1992)* och *de Bruin m. fl. (1994)* kan även eten anaerobt överföras till etan. Man erhöles 100 % anaerob deklorering av PCE (8 µM) till eten med efterföljande reduktion till etan, vid 10 °C (grundvattentemp.) och med en uppehållstid i reaktor på 6 timmar. Även bl a *Shimomura m. fl. (1999)* har visat att anaerob deklorering kan gå hela vägen till etan, om man kan åstadkomma starkt reducerade förhållanden (redox potential – 500 mV till – 700 mV). Nyligen har *Bradley och Chapelle (1999a)* visat att metan kan bildas vid anaerob nedbrytning av klorerade etener, t ex vinylklorid. *Dolfing (1999)* visade att denna typ av reaktion till och med skulle kunna vara en typ av dehalorespiration (dvs energi- och/eller celluppbyggande) med föreslagen initial reaktionsgång enligt  $2C_2H_3Cl + 2H_2O \rightarrow C_2H_4 + CH_3COOH + 2HCl$ , där acetatet skulle vara en intermediär vid fermentationen till metan. *Bradley och Chapelle (1999b)* fann indikationer på att reaktionen eventuellt kan vara av typen acetotrof metanogenesis.

Tabell 6.4.5 redovisar ett urval av rapporterade mikroorganismer, vilka har visat sig kapabla att anaerobt bryta ned klorerade alifater. Som nämnts ovan kan vissa bakterier, sk fakultativa anaerobor, arbeta under både anaeroba och aeroba förhållanden. Exempel på sådana är *Pseudomonas putida* och *Escherichia coli*. Förutom klorerade alifater, redovisar Tabell 6.4.6 ett urval av andra halogenerade alifater och cykloalkaner som rapporterats kunna brytas ned med hjälp av anaeroba angreppssätt.

Tabell 6.4.5. Anaerob nedbrytning av vissa halogenerade kolväten.

Halogenerade kolväten	Mikroorganismer	Referens (förutom nedan, även Baker och Herson, 1994)
Metylklorid (CM)	Acetobacterium dehalogenans	Holliger m. fl., 1999.
Kloroform (CF)	Metanogent	van Beelen P och van Keulen, (1990)
Diklormetan (DCM)	Anaerobt konsortium	Hughes och Parkin (1991)
	Acetogent konsortium	Freedman och Gossett (1991)
Koltetraklorid (tetraklormetan) (CT)	Metanogent	Bouwer och McCarty (1983a)
		Bouwer och Wright (1988)
	<i>Methanobacterium</i> sp.	Egli m. fl. (1987)
	<i>Desulfobacterium</i> sp.	Egli m. fl. (1987)
	<i>Clostridium</i> sp.	Galli och McCarty (1989).
	Denitrifierat	Rittmann m. fl. (1988)
	<i>Pseudomonas</i> (denitrifierande)	Criddle m. fl. (1990a)
	<i>Escherichia coli</i> K12	
	Anoxiskt	Criddle m. fl. (1990b)
	<i>Acetobacterium woodii</i>	Semprini m. fl. (1992)
		Hardman (1991)
1,2-Dikloreten (1,2-DCA)	Anaerobt konsortium	Bouwer och McCarty (1983a; 1983b)
1,1,1-Trikloreten (1,1,1-TCA)	Denitrifierat	Semprini m. fl. (1991)
	Sulfatreducerande	Klecka m. fl. (1990)
	Metanogent	Klecka m. fl. (1990)
	<i>Clostridium</i> sp.	Galli och McCarty (1989)
Vinylklorid (VC)	Anaerobt konsortium	Barrio-Lage m. fl. (1990)
Trikloreten (TCE)	Anaerobt konsortium	Kleopfer m. fl. (1985);
		Barrio-Lage m. fl. (1987)
Tetrakloreten (PCE)	Metanogent	Bouwer och McCarty (1983a)
		Parsons m. fl. (1984)
		Vogel och McCarty (1985)
	<i>Methanosarcinia</i>	Hardman (1991)
	Anaerobt konsortium	DiStefano m. fl. (1991)
	<i>Dehalospirillum multivorans</i>	Eisenbeis m. fl., (1997)
Opec. klor. alifater	Dehalospirillum sp.,	Diekert, (1999); Pas, (2000 )
	Desulfitobacterium sp.,	
	Dehalobacter restrictus	
	Dehalococcoides ethenogenes	Zinder, (2000)

Tabell 6.4.6. Ett urval av ytterligare anaerobt nedbrytbara halogenerade alifater och cykloalkaner (Borow m. fl., 1990; Ecova, 1990; Roberts m. fl., 1989; Visscher och Brinkman, 1989; Semprini m. fl., 1991).

1,1-Dikloreten	Hexaklorcyklobutadien	Dibromklormetan
1,1,2-Trikloreten	Hexaklorcyklopentadien	Tribrommetan
1,1,2,2-Tetrakloreten	Diklordiflourmetan	
Hexaklorcyklohexan	Triklortrifloreten	

#### 6.4.3.2. Aerob nedbrytning

Aeroba nedbrytningsmekanismer m a p klorerade alifater är fortfarande inte helt klarlagda. De kan dock i stort delas in i de två huvudgrupperna

- Aerob metabolism
- Aerob co-metabolism

Aerob metabolism innefattar metabolisk nedbrytning genom oxidation av kolekyl med produktion av bl a oorganisk klorid. Reaktionerna är principiellt likartade de som sker co-metaboliskt, se nedan, men kan utnyttjas av bakterierna som energi- och/eller kolkälla. Enligt *Leisinger och Braus-Stromeyer (1995)* kan klormetan och diklormetan användas av aeroba (och anaeroba) bakterier som metabolisk källa. Reaktionerna, som utförts av metylotrofa bakterier, är inte klarlagda, men kan eventuellt vara glutation-baserade (se Figur 6.4.6); vissa data tyder dock på annan hittills okänd reaktionstyp. Enligt *Parker och Mohr (1996)* kan mikroorganismer utnyttja 1,2-dikloretan och vinylklorid metaboliskt. I det sistnämnda fallet är troligtvis enzymet metan monooxygenas involverat (*van Hylckama Vlieg, 1999*). Vidare har *Bradley och Chapelle (2000)* funnit bevis på att 1,2-DCE kan brytas ned genom aerob metabolism. Man kunde dock i detta fall inte erhålla indikationer på att härav genererad energi kunna användas för celltillväxt. Slutligen kan noteras att en mikrobiell metabolisk oxidationsprocess som anses vara sällsynt är oxidation av kol-klor-bindning, eftersom det bara ger liten eller ingen energivinst (*Cs-Umt-Edu, 2000*).

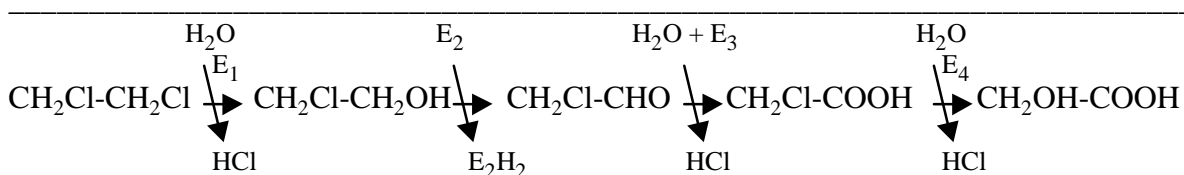
Förutom aerob metabolism kan alltså klorerade alifater även attackeras co-metaboliskt. Aerob co-metabolism anses vara betydligt vanligare än aerob metabolism. Mikroorganismer som lever på andra icke-klorerade kolväten producerar enzym som händelsevis också bryter ned det klorerade kolvätet. Organismen vinner inget på denna typ av deklorering; den sker på grund av att mikroorganismen inte är effektiv. Som exempel kan nämnas (mer information nedan) nedbrytning av en- eller två-klorerade alifater av sk metanotrofer (bakterier som metaboliserar metan). En typ av metanotrofer producerar en löslig typ av enzymet metan monooxygenas (sMMO) (den andra typen av MMO, s.k pMMO, är partikulärt, membran-, bundet). MMO är enzym som kan attackera och bryta ned många olika typer av molekyler, de är alltså inte ämnesspecifika. Man anser att det främst är sMMO som kan utföra co-metaboliska reaktioner (även pMMO kan bryta ned klorerade kolväten men med lägre effektivitet) och att produktion av sMMO synes reduceras om kopparjoner föreligger (*Tellez m. fl., 1998; Shigematsu m. fl., 1999*). Även Hg-, Zn- och Ni-joner anses inhiberande (*Grosse m. fl., 1999*).

Det anses vara lämpligt att det finns på gränsen till otillräckligt med metan närvarande för att den co-metaboliska nedbrytningen av klorerade kolväten utav metanotrofer skall ske i rimlig omfattning. Om inte tillräckligt med metan föreligger förökar sig inte organismen. Finns för mycket metan metaboliserar sMMO framför allt metan och ej det klorerade kolvätet. Vissa av dessa organismer kan vara kvävefixerare, som bl a innebär att de gynnas av underskott av kväve. I närvaro av höga nitrat- eller ammonium-koncentrationer konkurreras dessa ut av andra organismer. Metanotrofer kan producera sMMO; dessa lever bäst under lätt syrefattiga förhållanden (mikroaerofiler). Effektivt utnyttjande av metanotrofer in situ för sanering av klorerade kolväten kan alltså starkt bero på syrehalten; för hög syrehalt kan inverka negativt (*Chu och Alvarez-Cohen, 1999*). Under fullt aeroba förhållanden dominerar andra rent aeroba arter. Andra typer av bakterier som kan bryta ned klorerade kolväten co-metaboliskt är t ex toluen oxiderare, butan oxiderare och ammoniak oxiderare (nitrifierare) (*Cs-Umt-Edu, 2000*) (dvs t ex toluen eller butan måste finnas och inducera enzym som kan bryta ned det klorerade kolvätet).

Nedan beskrivs mer ingående olika aeroba reaktionsförlopp som mikroorganismerna använder vid nedbrytning av klorerade kolväten. Dessa är framför allt av formen Substitution och Oxygenolytisk dehalogenering, varvid den sistnämnda kan delas in i oxidering av en kol-kol dubbelbindning via epoxidering, i inkorporering av syre i en kol-väte bindning och i oxidering av en kol-klor bindning.

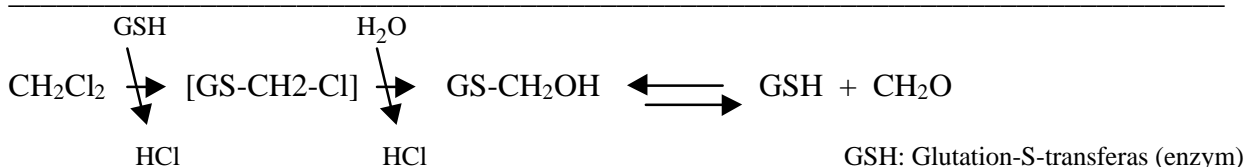
*Substitution* sker oftast med  $\text{OH}^-$  jon, men kan även ske med annan sk nukleofil som till exempel  $\text{HS}^-$  jonen (bisulfidjon). Dessa sker med hydrolytiskt respektive tiolytiskt dehalogenas enzym, båda involverade i reaktioner som utförs under aeroba förhållanden, det senare eventuellt också betydelsefull under anaeroba förhållanden. Observera att även om reaktionerna i allmänhet utförs av aeroba bakterier under aeroba förhållanden är reaktionerna inte strikt aeroba eftersom inget syre är involverad. Substitution anses gå mycket långsamt med halveringstider på åtskilliga år. Reaktionerna ändrar inre oxidationsstatus på den reagerande molekylerna och härav behöver inte reaktionerna någon extern elektron-donator och elektron-acceptor. Hydrolytiska och tiolytiska dehalogenaser har visat sig vara involverade i en allmän oxidativ metabolism med aeroba bakterier som endast behövde halogenerade kolväten som enda kol- och energikälla (alltså ej co-metabolism) (Holliger, 1992).

Figur 6.4.5 visar substitutionsreaktion i form av hydrolys med avseende på 1,2-dikloretan och Figur 6.4.6 visar substitutionsreaktion i form av tiolys.



E1: Haloalkan halidohydrolas; E2:Alkohol dehydrogenas; E3:Aldehyd dehydrogenas; E4: 2-halosyra halidohydrolas

Figur 6.4.5. Hydrolytisk reduktion m a p 1,2-dikloretan. E är förkortning för enzym (Hardman, 1991; Müller och Lingens, 1987; Erzmänn och Pöpel, 1991).



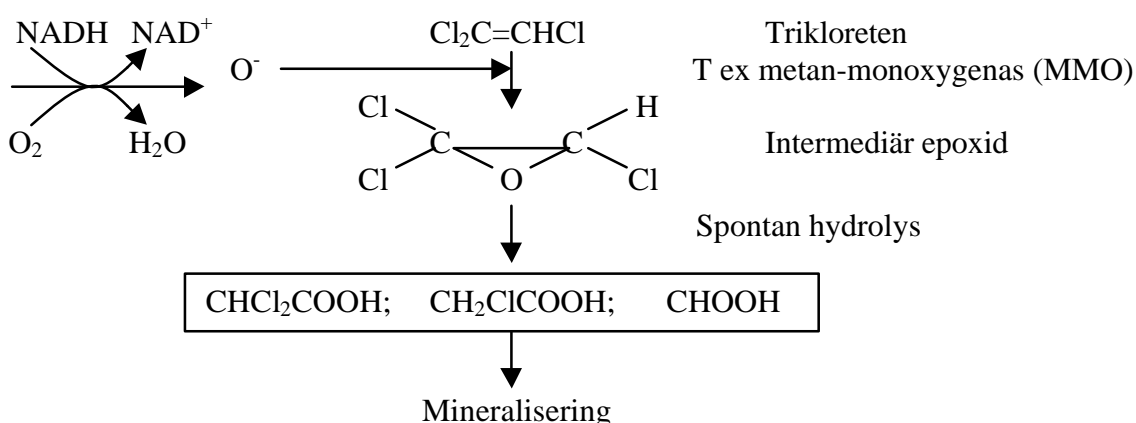
Figur 6.4.6. Tiolytisk reduktion m a p diklormetan (Hardman, 1991; Müller och Lingens, 1987).

*Oxygenolytisk dehalogenering (Oxidation)* innefattar co-metaboliska reaktioner där syre används som slutlig elektronacceptor. Lågklorerade alifater och anaerobt producerade toxiska intermediärer som vinylklorid, kan med fördel brytas ned och mineraliseras på detta sätt. Aeroba bakterier skiljer sig från anaeroba, metanogena, genom att de aeroba bl a klarar ca  $10^4$  gånger högre klorerade kolväte-koncentrationer, innan halten blir så hög att toxiska effekter, som motverkar nedbrytningen, eventuellt börjar göra sig gällande. Den toxiska nivån kan dock variera från fall till

fall beroende på bl a saneringsutförande, acklimatisering och mängd biomassa. Vid nedbrytning av högre klorerade alifater är nedbrytningsgraden av dessa dock lägre om nedbrytning utförs av aeroba mikroorganismer än av anaeroba, metanogena, kulturer (*Hardman, 1991*). För fullständig nedbrytning av högklorerade alifater krävs därför ofta en initial anaerob deklorering följt av en aerob mineralisering. De aeroba mineraliseringsreaktioner som sker initialt är då i allmänhet av formen oxygenolytisk deklorering och i allmänhet av co-metabolisk art.

Oxidation av ett klorerat kolväte anses ske genom 1/ **oxidering av en kol-kol dubbelbindning via epoxidering** 2/ **inkorporering av syre i en kol-väte bindning eller** 3/ **oxidering av en kol-klor bindning** (*Holliger, 1992*). Därtill kan nämnas att även bildning av klorerade kolväten från icke klorerade dito kan ske av bl a vissa bakterier. Den sistnämnda processen kallas bioklorering och innefattar reaktioner med omättade alifater i närvaro av väteperoxid och enzymssystem av typen haloperoxidaser (*Vogel m. fl., 1987*). Vid denna typ av reaktion sker alltså inte någon nedbrytning av klorerade alifater (alltså ingen dehalogenering) och tas inte närmare upp här.

Epoxider bildas som mellansteg vid **epoxidering** av kol-kol dubbelbindningar, med slutlig mineralisering till bl a koldioxid (*van Hylckama Vlieg, 1999*). Enligt *Fogel m. fl. (1986)* har *Hou m. fl. (1979)* beskrivit att icke-klorerade etener omvandlas till epoxider, med hjälp av metanotrofa bakterier, Figur 6.4.7. Epoxider är i allmänhet toxiska och kan eventuellt vara cancerogena. *Mil-ler och Guengerich (1982)* och *Guengerich m. fl. (1979)* visade emellertid att genererade epoxider är kortlivade ämnen. Halveringstiden för en TCE-epoxidmolekyl befanns vara ca 12 sekunder och för monokloreten-epoxid erhöles en halveringstid av ca 1 minut (vissa epoxider kan dock ha längre halveringstid, se under sanering nedan). Emellertid finns möjligheter att, fastän dessa epoxider är kortlivade, de genom fri radikalproduktion negativt kan påverka själva nedbrytningsenzymet (här sMMO) (*Chu och Alvarez-Cohen, 1999*), eventuellt till den grad att nedbrytningen avstannar. I försök att finna metod för minimering av denna effekt fann *Palumbo m. fl. (2000)* att tillsats av kalciumkarbonat och format hade fördelaktiga effekter på upprätthållandet av enzymets aktivitet, medan citronsyra (som egentligen är en fri radikalhämmare) hade negativ effekt.



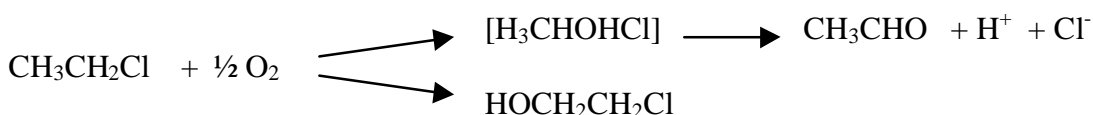
Figur 6.4.7. Aerob metanotrof nedbrytning av trikloreten (det första steget, ovan m h a till exempel MMO) (delvis från *Hardman, 1991*).

Frånvaron av långlivade toxiska intermediärer, och därtill att metanotrofa bakterier odlas och tillväxer mycket snabbare än metanogena (anaeroba), har varit bidragande orsaker till att mer ingående studera aerob nedbrytning av klorerade alifater. Starka indikationer har då framkommit



att aerob nedbrytning av ett flertal klorerade alifater till stor del är beroende av co-metaboliska processer (liksom i anaeroba dekloreringsprocesser, dock med andra reaktioner och angreppssätt). Man har t ex funnit att aerob nedbrytning av TCE främst är beroende av inducering av enzym-system relaterade till nedbrytning av bl a fenol, kresol, toluen, isopren och metan (EPA, 1992; Tovanabootr m. fl., 1997) (dvs t ex fenol, kresol, toluen, isopren och/eller metan måste finnas och inducera enzym som kan bryta ned det klorerade kolvätet).

Trikloretan (TCE) är en relativt högklorerad alifat. Ändå har flera rapporter visat att TCE kan brytas ned oxygenolytiskt. Så har skett av metanotrofa bakterier med enzymsystemet metan-monooxygenas (MMO) (Wilson och Wilson, 1985; Fogel m. fl. 1986; Strand och Shippert, 1986; Little m. fl., 1988), av ammonium oxiderade bakterier med enzymsystemet ammonium-monooxygenas (AMO) (Rasche m. fl., 1990a; Arciero m. fl., 1989), av toluen oxiderande bakterier med enzymsystemen toluen-monooxygenas och toluen-dioxygenas (Nelson m. fl., 1988; Wackett och Gibson, 1988) och av propan-oxiderande bakterier genom användandet av propan-oxygenas (Wackett m. fl., 1989). Användandet av dessa enzymer indikerar att nedbrytningsprocessen är av co-metabolisk art. I de allra flesta fall har epoxidering anses vara mest relevant. MMO är en grupp enzymer med brett nedbrytningsregister. MMO kan genomföra katalytisk oxidation med molekylärt syre av n-alkaner till aldehyder och alkoholer, av n-alkener till epoxider och av alkylbensener till bl a fenoler. MMO kan även oxidera klorerade analoger till dessa alkaner, alkener och alkylbensener (Baker, 1994, Fogel m. fl., 1986). I fallet oxidation av klorerade alkaner kan initial reaktion anses vara av typen **inkorporering av syre i en kol-väte bindning**. Rasche m. fl. (1990a) har föreslagit reaktionsförlopp enligt Figur 6.4.8 vid nedbrytning av monokloretan.



Figur 6.4.8. Föreslagen reaktionsgång för oxidation av klorerad alifat (m h a AMO) (Rasche m. fl., 1990a).

**Oxidering av en kol-klor bindning** innefattar oxidation av klorret via en instabil sk halosyl intermediär ( $\text{CH}_2\text{Cl}^+=\text{O}^-$ ). Denna antas snabbt hydrolyseras till en alkohol och hypokloritjon. I något fall finns indirekt indikation på att reaktionen kan ha ägt rum, men eftersom inte själva intermediär-en/-erna av klorerade alifater ännu har detekterats från bakterier antas att denna typ av reaktion vara mycket sällsynt vid deklorering av klorerade alifater (Vogel m. fl., 1987).

Co-metaboliska processer kan alltså användas för aerob nedbrytning av relativt högklorerade alifater som TCE. Exempel på detta visade Nelson m. fl. (1987). De beskriver studier av en gram-negativ bakterie G4 vilken aerobt fullständigt mineraliserade TCE till oorganiskt klorid och  $\text{CO}_2$ , genom inducering med bl a fenol. Man visade bl a att också toluen, o-kresol och m-kresol kunde användas för att co-metaboliskt bryta ned TCE. I deras fall erhöles emellertid ingen stimulering m h a natriumbenzoat, m-xilen och p-kresol. Resultaten indikerade reaktioner vilka innefattade inducering av samma enzym-system som deltagar i ringöppning av aromater genom meta-fission.

Vid den här tidpunkten var det inte klarlagt vilken/vilka typer av enzym som var ansvariga för nämnda nedbrytning. Hypotetiskt skulle toluen-monooxygenas och/eller -dioxygenas kunna vara involverade. Vad gäller dioxygenas hänvisade man till resultat som indikerat att bakterien *Pseudomonas putida* F1 hade utnyttjat toluen-2,3-dioxygenas vid nedbrytning av TCE. På basis av resultat från efterföljande tester lutade man åt att ansvarigt enzym i G4 var monooxygenas (MO). Enligt *EPA (1993)* är G4 speciellt värdefull eftersom denna bakterie, som enligt dem definieras som *P. cepacia* G4, inte producerar toxiska mellanprodukter som vinylklorid. Enligt *Harker m. fl. (1994)* utförs TCE-nedbrytning av *P. cepacia* G4 genom användandet av enbart ett specifikt enzymkomplex. Genetiska indikationer finns att detta enzymkomplex eventuellt kan vara av typen fenol-hydroxylas.

*Nelson m. fl. (1988)* beskriver ett flertal bakterier, isolerade från naturlig mikroflora, bl a två typer av *P. Putida*, vilka aerobt kan bryta ned TCE genom inducering med lämplig aromat. En stam visade sig utnyttja toluen-dioxygenas. Man fann också att nedbrytning av TCE inte kunde utföras av de av deras mikroorganismer, som innehade andra typer av dioxygenaser än toluen-dioxygenas. Upptäckterna sammanfattades med konstaterandet att TCE's dåliga nedbrytningsgrad i naturen inte beror på frånvaron av TCE-nedbrytande mikroorganismer. Istället ansågs den dåliga nedbrytningsgraden bero på frånvaron av lämpliga substrat i föroreningen, som t ex toluen eller fenol, vilka kan inducera produktionen av lämpliga enzym som co-metaboliskt kan bryta ned TCE hos dessa mikroorganismer. Vad gäller tillsatsämnes betydelse för co-metabolisk nedbrytning av klorerade kolväten hänvisade man även till andra rapporter, bl a av *Wilson och Wilson (1985)*, vilka visat att TCE kunde brytas ned av metanotrofa bakterier under tillsats av naturgas.

Ovan nämnd bakterie "G4" hittades i naturen. En nackdel med denna bakterie är att den kräver närvaro av miljöfarligt fenol eller toluen för nedbrytning av klorerat kolväte. En laborativt modifierad typ av G4, patenterad och kallad PR1 (*Pseudomonas cepacia* G4 5223 PR1) har bl a därför tagits fram (*EPA, 1993*). Denna benäms av *Malusis m. fl. (1997)* som *Burkholderia cepacia* PR1. Även den generella reaktionsgången för mineralisering av TCE, via monooxygenas-enzym, som används av G4 och PR1 har patenterats. PR1 är en genetiskt förändrad form av G4, i vilken den mobila transposonen Tn5 har tillsatts. PR1 har visat sig ha en fördel framför G4 som består i att PR1 inte behöver fenol eller toluen för att få igång produktionen av det enzymesystem (enligt *Malusis m. fl., 1997*, av den icke-specifika typen toluen-orto-monooxygenas) som bryter ned TCE. PR1 anses, av US EPA, därmed vara ett miljövänligare alternativ till G4 (info om bl a dessa bakteriers olika produktion av enzym kan erhållas i *Swadley m. fl., 1999*). Även en variant av PR1 har tagits fram (kallad ENV-435) med den egenskapen att den inte har "gripdon" som annars skulle fästa den på materialytor, vilket kan vara till fördel för god distribution in situ (*Malusis at al., 1997*).

PR1 har en egen inbyggd regulator som aktiverar produktionen av toluen-orto-monooxygenas, vilket uppges vara huvudenzymet för dess nedbrytning av TCE. En nackdel med PR1 är att den kräver tillsats av kontinuerlig och konstant halt näringsämne, eftersom den inte enbart kan livnära sig på TCE. Forskning pågår därför att finna lämplig inkapsling och konstant utsöndring av näringsämne och syre till PR1. Enligt *EPA (1993)* har ytterligare en variant av G4 isolerats (*Pseudomonas cepacia* GM-5223-PHE1) som har visat sig kunna bryta ned både klorerade alifater och aromater.

*Henson m. fl. (1988)* fann signifikant, aerob, metanotrof mineralisering av DCM, *trans*-1,2-DCE, CF, 1,2-DCA, TCE, och 1,1,1-TCA i fin sand då den utsattes för 4 %-ig metanatmosfär. Då tillförsel av metan avbröts registrerades en mindre nedbrytning, men den fullständiga mineralise-

ringen av dessa ämnen avstannade helt. Denna efterföljande nedbrytning antogs ha berott på att andra typer av bakterier än de metanotrofa, exempelvis av liknande typ som beskrivits av *Nelson m. fl.* (1987) ovan (G4), kunde ha varit närvarande. De aromatiska komponenterna, nödvändiga för nedbrytningen av de klorerade alifaterna, skulle då ha kommit från den naturliga sanden. Därtill framlades hypotesen att även metaboliska produkter från metanotrofa bakterier skulle ha stimulerat tillväxten av G4-liknande bakterietyper.

Ett problem med oxygenas-baserade nedbrytningssätt är att reaktionerna kräver hög syrehalt (ca 3,5 mg O<sub>2</sub>/mg CH<sub>4</sub>). Eftersom syre löser sig relativt dåligt i vatten kommer metanhalter av något-några få mg att konsumera allt löst syre (om inte syre kontinuerligt tillförs). Ett annat problem, i de fall inducering/co-metabolism krävs, är att närvaro av t ex metan fördelaktigt inducerar produktion av motsvarande MMO (metan-monooxygenas), men att sådana enzym helst vill bryta ned det/de ämne/n det ursprungligen är designat för (i det här fallet metan), och inte det klorerade kolvävet. Som indikerats ovan, väl utförd saneringsdesign, bl a optimerad *in situ* pulsring (tilförsel i cykler, se nedan), kan minska dessa problem.

Ett urval av ämnen som kan tillsättas för att co-metaboliskt bryta ned klorerade kolväten, kopplat till enzymer och mikroorganismer, ges i Tabell 6.4.7.

Tabell 6.4.7. Co-metabolism av några klorerade alifater utav mikroorganismer (Santas och Santas, 1994; Harker m. fl., 1994; Nelson m. fl., 1988; Leahy och Brown, 1994; Rasche m. fl., 1990a, 1990b).

Klorerad alifat	Induceringsämne	Enzym	Organism
Diklormetan (DCM); Triklormetan (CF)	metan	sMMO	<i>Metylosinus trichosporium</i> OB3b
	ammoniak	AMO	<i>Nitrosomonas europea</i>
1,1-Dikloreten (1,1-DCA); 1,2-Dikloreten (1,2-DCA)	metan	sMMO	<i>Metylosinus trichosporium</i> OB3b
1,1,2-Trikloretan (1,1,2-TCA) och 1,1,1-TCA	ammoniak	AMO	<i>Nitrosomonas europea</i>
1,1,2-Trikloretan (1,1,2-TCA)	kamfer	P450	<i>Pseudomonas putida</i> PpG-786
Monokloreten (VC); 1,1-Dikloreten (1,1-DCE)	metan	sMMO	<i>Metylosinus trichosporium</i> OB3b
	ammoniak	AMO	<i>Nitrosomonas europea</i>
	propan	PMO	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>cis</i> -1,2-Dikloreten ( <i>cis</i> -DCE); <i>trans</i> -1,2-Dikloreten ( <i>trans</i> -DCE)	metan	sMMO	<i>Metylosinus trichosporium</i> OB3b
	propan	PMO	<i>Mycobacterium</i> spp.
Trikloretan (TCE)	metan	sMMO	<i>Metylosinus trichosporium</i> OB3b
	ammoniak	AMO	<i>Nitrosomonas europea</i>
	toluen	MO	<i>Pseudomonas cepacia</i> G4 <sup>1</sup>
		p-TMO	<i>Alcaligenes eutrophus</i> AEO 106
		m-TMO	<i>Pseudomonas mendocina</i>
	fenol	TO	<i>Pseudomonas pickettii</i> PKO1
			<i>Pseudomonas putida</i> F1/ <i>Escherichia coli</i>
	propan	PMO	<i>Mycobacterium</i> spp.
	bifenyl		<i>Beijerinia</i> sp.
	2,4-D		<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134
1,2-Diklorpropan	metan	sMMO	<i>Metylosinus trichosporium</i> OB3b
	ammoniak	AMO	<i>Nitrosolobus multififormis</i>
			<i>Nitrosomonas europea</i>
1,2,3-Triklorpropan	ammoniak	AMO	<i>Nitrosomonas europea</i>

<sup>1</sup> Harker et al (1994) har föreslagit att det TCE-nedbrytande enzymet är PhH (fenol-hydroxylas).

Flertal exempel på fördelen med pulserad tillförsel av kolkälla vid biologisk saneering av klorerade kolväten ges i kapitel 5.3. Det kan tilläggas att *Lanzarone och McCarty (1990)* fann att cyklisk tillsats av metan (4,5 mg/l) gav bättre nedbrytningsgrad, i det här fallet av TCE, än vid kontinuerlig tillsats av samma halt metan. I det senare fallet avstannade TCE-nedbrytningen. Man fann även att tillsats av näringsämnen i form av ammonium och fosfat inte gav någon ökad TCE-nedbrytning. Ett annat exempel ges av *Speitel och Leonard (1992)*. De jämförde två olika bioreaktorutföranden, sekventiell och packad bädd (kontinuerlig tillsats/flöde), i vilka mikroorganismen *M. trichosporium OB3b* utnyttjades för nedbrytning av CF (100 µg/l). Metan tillfördes och man fann att nedbrytningen av CF var betydligt effektivare i sekventiellt reaktorutförande än i packad bädd.

#### 6.4.3.3. Anaerob-aerob nedbrytning

Av ovanstående framgår att mineralisering av högklorerade kolväten, främst maximalt klorerade som t ex PCE, kräver en initial anaerob attack med efterföljande aerob mineralisering. Även relativt högklorerade kolväten som TCE och TCA kan ibland vara lämpliga att initialt attackeras anaerobt, även om man alltså i vissa fall funnit mikroorganismer som kan bryta ned och mineralisera dessa ämne aerobt. Vid den anaeroba attacken kan dock toxiska intermediärer som vinylklorid (VC), men även diklormetan (DCM) och dikloretan (DCA) (*Lew och Bouwer, 1988; Bouwer och McCarty, 1983a; 1983b*) och i vissa fall även H<sub>2</sub>S (*Newberg m. fl., 1997*) bildas. Överförs dessa intermediärer till aeroba reaktionsförhållanden kan de däremot vidare brytas ned och mineraliseras.

Följande är ett exempel på undersökning som visat fördelen med sekventiell anaerob-aerob nedbrytning. *Long m. fl. (1993)* genomförde en studie vilken innefattade behandling av en blandning av tolv klorerade alifater (CAC) i anaeroba och aeroba reaktorsystem som kördes separat och i serie. De tolv CAC var CF, CT, 1,1-DCA, 1,1,1-TCA, HCA, 1,1-DCE, *trans*-1,2-DCE, TCE, PCE, 2-CPE, 1,1-DCPE och 1,2,3-TCPA. I det aeroba systemet tillsattes metan, fenol och toluen för att utveckla lämpliga mikrobiella kulturer som kunde bryta ned klorerade alifater co-metaboliskt. Till systemen tillsattes växtsubstrat som glukos, acetat, bensoat och fenol.

I enbart det separata anaeroba systemet erhöles ingen signifikant nedbrytning av fem, utav de tolv tillsatta, CAC som klorerade propener, 1,1-DCA, *trans*-1-2-DCE och 1,2,3-TCPA. Övriga CAC transformerades dock genom reduktiv dehalogenering, men med en koncentrationsökning av intermediärer i form av VC, DCM och *cis*-1,2-DCE. I enbart det separata aeroba systemet erhöles nedbrytning av alla tillsatta CAC, med undantag av de mest klorerade varianterna CT, HCA och PCE. I det kombinerade sekventiella anaeroba-aeroba systemet erhöles, inom försökstiden, fullständig mineralisering av de tolv CAC, med undantag av två klorerade propener (2-CPE; 1,1-DCPE; 60 %- resp. 50 % reduktion) och två klorerade etaner (1,1-DCA, 1,1,1-TCA; 92 %- resp. 84 %-reduktion). Orsaken hänfördes till att de 12 olika CAC hade tillsatts som en blandning och därför blev mikrobiologiskt behandlade i olika grad samtidigt. Parallell undersökning visade att högre mineraliseringsgrad kunde erhållas av de tolv då varje enskild CAC tillsattes var för sig.

På liknande sätt (initialt anaerobt med efterföljande aerobt steg) har *Saberiyam m. fl. (1997)* visat att PCE kan mineraliseras i vatten med en initialkoncentration av upp till 0,4 mg/l. *Edwards och Cox (1997)* fann att sekventiell anaerob-aerob nedbrytning kan ske naturligt i grundvatten förorenade med betydligt högre halter (upp till 35 mg/l) av klorerade kolväten.

## 7. VAL AV STRATEGIER VID BIOSANERING

### 7.1. Val av saneringsmetod

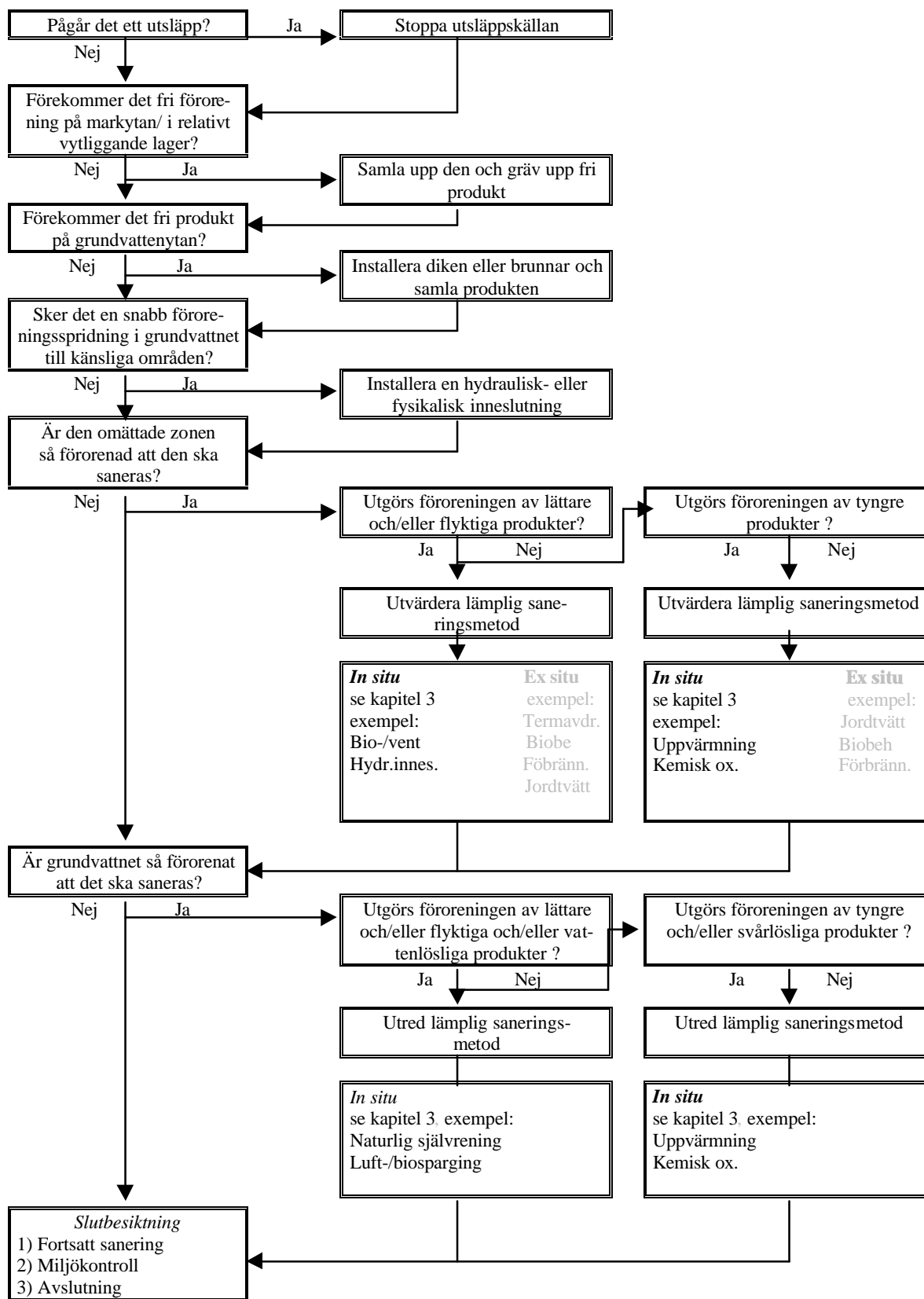
Vid val av efterbehandlingsmetod för ett oljeförorenat markområde bör man ställa sig frågan; vilken eller vilka efterbehandlingsmetoder uppfyller uppställda miljömål på det kostnadseffektivaste sättet? Följande faktorer är då viktiga att klargöra (*Lindmark och Larsson, 1995*):

- Föroreningstyp, mängd och koncentration
- Förekomst i fri fas, jord, grundvatten
- Vertikal- och horisontell utbredning
- Jordart - kornstorlek, humushalt, näringsinnehåll, pH, permeabilitet
- Hydrogeologi - avstånd till grundvattenytan, strömningsriktning, strömningshastighet
- Heterogenitet - jord/fyllning/berg/ledningar m m
- Klimat - nederbörd, temperatur, vindriktning
- Saneringsmetodernas status, erfarenheter, tillgänglighet
- Restprodukter och intermediära föreningar som uppkommer vid sanering
- Arbetsmiljöförhållanden vid sanering
- Tidsaspekter
- Kostnader - kapital och drift för den totala operationen
- Metodens kapacitet och effektivitet
- Markanvändning - lekplats, bostäder, industrier, parker, jordbruk, friluftsliv
- Uppsatta gränsvärden/miljömål
- Avstånd till känsliga områden, djur, människor
- Lokala opinioner

Ett flödesschema för vägledning vid val av åtgärd presenteras i figur 7.1. Observera att flera skeden som utförs i samband med utredningar av förorenade markområden som fältundersökning i flera steg, laboratorieanalyser, riskbedömning m m inte framgår explicit av figuren.

Valet av efterbehandlingsmetod påverkas av om det är frågan om en akutsanering, t ex ett plötsligt brott i någon anslutning eller utsläpp av stora mängder bensen vid tankbilsolycka, eller om det är en efterbehandling av ett område som varit förorenat under en längre tid. Om det är frågan om akutsanering är tidsaspekten helt avgörande och syftet är då att stoppa utsläppskällan, samla in så mycket fri produkt som möjligt, gräva upp förorenad jord för att förhindra vidare spridning samt eventuellt att gräva diken och bygga vallar för att förhindra yttlig spridning. Vid akutsanering kommer sällan några andra metoder ifråga.

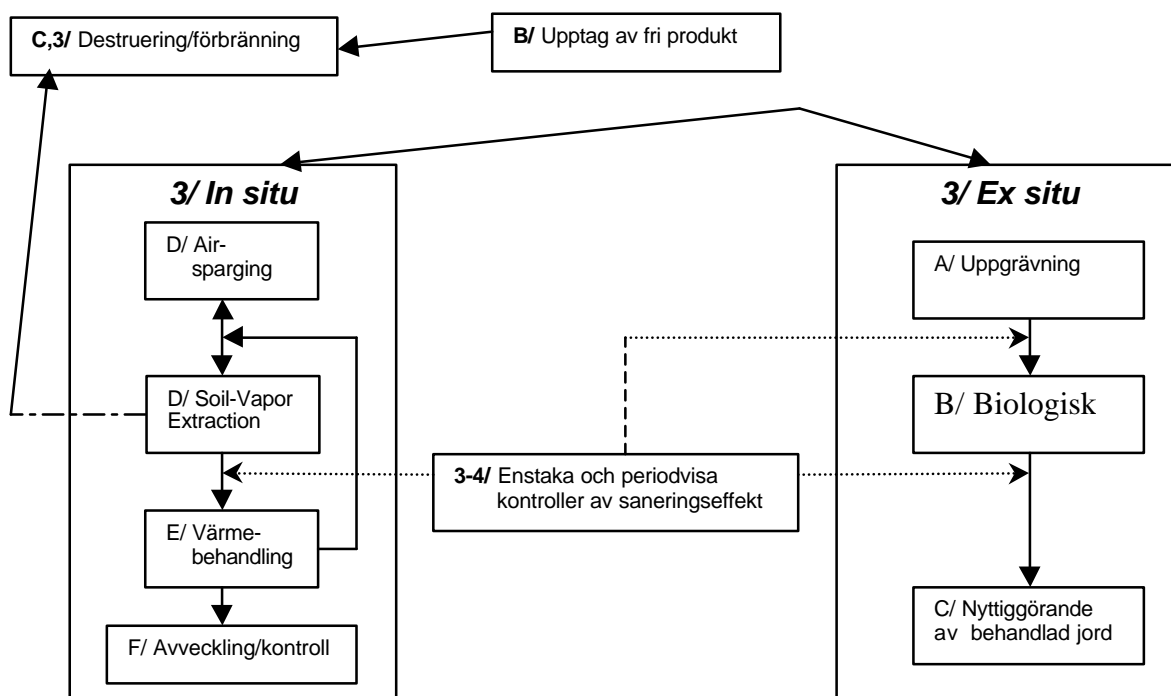
När det akuta skedet är avklarat eller om området är förorenat sedan tidigare måste ett val mellan alternativa tekniker göras med tanke på faktorerna ovan. Ju mer fakta om markföroreningen som finns desto bättre kan detta val göras. Det innebär att en kvalificerad miljögeoteknisk undersökning först måste genomföras för att avgöra vilken typ av förorening som är aktuell, koncentration, utbredning i vertikal- och horisontell riktning m m. Även hydrogeologiska faktorer som jordlagerföljd, permeabilitet, grundvattenströmning, heterogenitet, nedgrävda ledningar mm måste utredas och markeras på kartor.



Figur 7.1. Vägledande flödesschema för val av åtgärd vid sanering av organiskt förorenad mark (princip från Lindmark och Larsson, 1995).

## 7.2 Integrerade behandlingssätt och behandlingståg

I de fall föroreningen föreligger differentierat, t ex i olika permeabla lager, i olika lager med varierande organisk halt, med stor variation i koncentration, med olika typer av föroreningar, i grundvattnet och/eller i omättad zon och/eller i fri fas, är ofta användandet av enbart en saneringsmetod inte tillräckligt för att rena hela området. Istället krävs en integrering av flera kontroll- och behandlingsmetoder för att erhålla tillfredsställande reduktion av föroreningshalt samt toxicitet och mobilitet. Med ett behandlingståg (fritt översatt från amerikanskans "Treatment train") kombineras och optimeras olika metoder för själva saneringsförloppet med förbehandlings-, och/eller efterbehandlingsaktiviteter, med avsikt att nå de platsspecifika saneringsmålen. Behandlingståg innebär ofta olika saneringsaktiviteter vid olika tidpunkter, dock kopplade till varandra, medan uttrycket "integrerade angreppssätt" ofta används då olika metoder samtidigt används under saneringen. Exempelvis kan ett implementerat saneringståg bestå av laborativa förtester, kontroll och minimering av human- och miljömässig exponering vid saneringen, uppumpning/uppgrävning av fri organisk produkt ("hot spots"). Detta kopplas till efterföljande destruering/förbränning, biologisk sanering av organiskt förorenad jord och/eller grundvatten innehållande moderata halter och immobilisering av oorganiska föroreningar i jord, se Fig. 7.2. Den biologiska saneringsdelen utförs i behandlingståget efter att fri produkt tagits upp. Själva den biologiska behandlingsdelen kan även i sig bestå av ett "tåg"; t ex uppgrävning, kompostering och därefter nyttiggörande av färdig-komposterat material. Komposteringen kan bestå av täckning, tillsättning av nedbrytningshjälpande ämnen och mätning av behandlingsförloppet. In-situ behandlingen kan vara integrerad som t ex air-sparging i grundvattnet kopplat till bioventilering av ovanliggande omättad jord.



Figur 7.2. *Behandlingståg och integrerat arbetssätt. I exemplet motsvarar behandlingståget rutor i nummerföljd och bokstavsföljd. Rutor med samma nummer eller bokstäver ingår i begreppet integrerat arbetssätt. Undantaget 3/ In situ och 3/ Ex situ som kan utföras samtidigt på olika delar av det förorenade området, dock normalt inte fullt integrerat.*

## 8. REFERENSER

- Acero J., Stemmler K., von Gunten U., 2000. Degradation kinetics of atrazine and its degradation products with ozone and OH radicals: A predictive tool for drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 34:591-597.
- Ad hoc, 1994/Siemens AG, Germany. Ad hoc group of Government experts for biotechnology for a clean environment (1994): Prevention, detection and remediation. OECD Environmental Directorate. DSTI/STP/BE(93)7.
- Aeckersberg F., Rainey F., Widdel F., 1998. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.*, vol. 170, no 5, pp. 361-369. ([http://www.mpg.de/reports/9845/9845\\_O.htm](http://www.mpg.de/reports/9845/9845_O.htm))
- AFCEE, 2000. Bioventing. <http://www.afcee.brooks.af.mil/er/ert/bioventing.htm>
- Alexander M., 1994. Biodegradation and bioremediation. ISBN 0-12-049860-X. Academic Press Inc.
- Arciero D., Vannelli T, Logan M., Hooper A. B., 1989. Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical and Biophysical Res. Communications.* 159:2; p640-643
- Aronstein B., Calvillo Y., Alexander M., 1991. Effects of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* 25:1728-1731.
- Aziz C., Newell C., Gonzales J., Haas P., Clement P., Sun Y., 1999. BIOCHLOR natural attenuation model for chlorinated solvent sites. I Natural Attenuation of Chlorinated Solvents, Petroleum Hydrocarbons, and other Organic Compounds. Alleman, Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.83-88.
- Baker K., 1994. Bioremediation of surface and subsurface soils. I Baker K., Herson D. (eds.) *Bioremediation*, ISBN 0-07-003360-9
- Baker K., Herson D., 1994. Microbiology and Biodegradation. I Baker K., Herson D. (eds.) *Bioremediation*, ISBN 0-07-003360-9.
- Baker R., Smith G., Blechinger F., 1999. Full-scale bioslurping design, installation, operation and completion. I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 149-154.
- Ballapragada B., Stensel H., Puhakka J., Ferguson J., 1997. *Environ. Sci. Technol.*, vol 31(6), p. 1728-1734.
- Banat I., 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology* Vol. 51. pp. 1-12.
- Barr D.P. and Aust S.D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28:78A-87A.
- Barrio-Lage G., Parsons F., Narbiatz R., Lorenzo P., 1990. Enhanced anaerobic biodegradation of vinyl chloride in ground water. *Environ. Toxicol. Chem.*; 9, p 403-415.
- Barrio-Lage G., Parsons F., Nassar R., Lorenzo P., 1987. Biotransformation of trichloroethane in a variety of subsurface materials. *Environ. Toxicol. Chem.*; 6, p 571-578.
- Bass D., Brown R., 1997. Performance of air sparging systems – a review of case studies. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 1. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 117-122. ISBN 1-57477-026-8.



- Becker D., Baker R., 1998. Introducing USACE's new in-situ air sparging manual. Proceedings. "Environmental Technology: Preserving the Balance" Third Tri-Service Environmental Technology Workshop. 18-20 August 1998 - San Diego, California 2001-02-07: <http://aec-www.apgea.army.mil/prod/usaec/et/etw/03.htm>
- Becvar E., Vogel C., Sewell G., Gosset J., Zinder S., Magar V., 1997. In situ dechlorination of solvents in saturated soils. In *Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 3, p. 39-44. 4:th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., Apr. 97, N. Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Beller H., Grbic-Galic D., Reinhard M., 1992. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(3):786-793.
- Benning och Sabalowsky, 1996. Soil vapor extraction. 2001-02-07: [http://www.ce.vt.edu/program\\_areas/environmental/teach/gwprimer/svent/svent.html](http://www.ce.vt.edu/program_areas/environmental/teach/gwprimer/svent/svent.html)
- Berekaa M., Steinbüchel A., 2000. Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (Squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 10, pp. 4462-4467.
- Borden R.C. 1994. Natural bioremediation of hydrocarbon-contaminated ground water. In: *Bioremediation of ground water and geological material*. Editor Kerr R.S. p. 9-1:9-23. ISBN:0-86587-404-2.
- Borow H., Maziarz T., Mahaffey W., Whitlock T., 1990. Development of bioremediation strategy for contaminated soils, surface and groundwater. Företagspublikation, Ecova Corp. USA.
- Bourquin, A., 1989. Bioremediation of hazardous waste. *Hazardous Materials Control*, vol. 2, nr. 5, s 16ff.
- Bouwer E., 1994. Bioremediation of chlorinated solvents using alternative electron acceptors. i Norris R., m. fl., *Handbook of Bioremediation*. R. S. Kerr Environ. Res. Lab. ISBN 1-56670-074-4. p. 149-175.
- Bouwer E., McCarty P., 1983(a). Transformations of 1- and 2-carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(4), p. 1286-1294.
- Bouwer E., McCarty P., 1983(b). Transformations of halogenated organic compounds under denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 4, p. 1295-1299.
- Bouwer E., Wright J., 1988. Transformation of trace halogenated aliphatics in anoxic biofilm columns. *J. Contaminant Hydrol.* 2: p. 155-169.
- Bradley P., Chapelle F., 1996. Anaerobic mineralization of vinylchloride in Fe(III)-reducing aquifer sediment. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 30(6), p. 2084-2086.
- Bradley P., Chapelle F., 1999a. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, pp. 653-656.
- Bradley P., Chapelle F., 1999b. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, No. 13, p. 2304.
- Bradley P., Chapelle F., 2000. Aerobic microbial mineralisation of dichloroethene as sole carbon substrate. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 34, pp. 221-223.
- Bradley P., Landmeyer J., Chapelle F., 1999. Aerobic mineralization of MTBE and tert-butyl alcohol by stream-bed sediment microorganisms. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, pp. 1877-1879.
- Britton L., 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. *Microbiology Series*, vol 13; ed. Gibson. ISBN 0-8247-7970-3. Dekker Inc.
- Broholm K., Christensen T., Jensen B., 1991. Laboratory Feasibility studies on biological in-situ treatment of a sandy soil contaminated with chlorinated aliphatics. *Environmental Tech.* Vol. 12, p. 279-289.
- Brouman M., Tischuk M., Klingel E., Sick M., Smyth D., Sudicky E., Shikaze S., Borchert S.,

- Brown D., Knightes C., Peters C., 1999. Risk assessment for polycyclic aromatic hydrocarbon NAPLs using component fractions. *Environ. Sci. Technol.* Vol 33. 24:4357-4363.
- Bumpus J., 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, p. 154-158.
- Buzea D., DeStefanis E., 1999. Accelerated bioremediation as an alternative to conventional remedial technologies. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 427-432.
- Buzzelli M., Persiani L., Bison P., Buongarzone E., Ermolli F., Pugi S., 1997. Application of an integrated treatment system for petroleum-contaminated soil. *I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 1*. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 423-434. ISBN 1-57477-026-8.
- Caldwell M., Garrett R., Pringe R., Suflita J., 1998. Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 32, no 14, pp. 2191-2195.
- Camesano T., Logan B., 1998. Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 32, no. 11, pp. 1699-1708.
- Carberry J., 1994. Enhancement of bioremediation by partial preoxidation. *i Wise D., Trantolo D., (eds.), Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils*. ISBN 0-8247-91606.
- Carr C., Hughes J., 1999. Response to 'Comment on "Enrichment of high-rate PCE-dechlorination and comparative study of lactate, methanol, and hydrogen as electron donors to sustain activity"'. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, pp. 2683-2684.
- Carr C., Hughes J., 1998. Enrichment of high-rate PCE-dechlorination and comparative study of lactate methanol, and hydrogen as electron donors to sustain activity. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 32, p. 1817-1824.
- Carvalho D., Marchi D., Durrant L., 1997. Production of extracellular surface-active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. *I In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4*. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, New Orleans. pp. 91-96.
- Cerniglia C., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodeg.* 3:351-368.
- Cerniglia C., 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *i Advances in Applied Microbiology*, Vol. 30, p. 31-69. ISBN 0-12-002630-9.
- Chapelle F., 1993. *Ground-water microbiology & geochemistry*. ISBN 0-471-52951-6.
- Chen C., Puhakka J., Ferguson J., 1996. Transformation of 1,1,2,2-tetrachloroethane under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 30(2), p. 542-547.
- Chitla R., Portier, R., 1997. In situ bioremediation of diesel contamination in low-permeability soils. *I In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 5*. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, New Orleans. pp. 535-540.
- Chiu Y., Lu C., Yeh M., Yang C., 1999. *I Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination*. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.205-210.
- Cho H., Jaffe P., 1990. The volatilization of organic compounds in unsaturated porous media during infiltration. *J. Contaminant Hydrology*, vol. 6 nr 4, pp. 387-410.
- Chu K., Alvarez-Cohen L., 1999. Evaluation of toxic effects of aeration and trichloroethylene oxidation on methanotrophic bacteria grown with different nitrogen sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 65, No. 2, p. 766-772.

- Chu K., Jewell W., 1994. Treatment of tetrachloroethylene with anerobic attached film process. *J. Envir. Engrg, ASCE*, Vol. 120, No 1, p 58-71.
- Churchill P., Dudley R., Churchill S., 1995. Surfactant-enhanced bioremediation. *Waste Management*, vol 15, No.5/6, pp. 371-377. 0956-053x(95)00036-4
- Coates J., Anderson R., Lovely D., 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing condition. *Appl. Environ. Microbiol.*62(3):1099-1101.
- Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philip P. and Lovely D.R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9):3589-3593.
- Concawe (1979): Protection of groundwater from oil pollution. Report nr.3/79, Concawe, Den Haag.
- Criddle C., 1989. Ph.D. thesis, Stanford University, Stanford, California, U.S.A.
- Criddle C., Dewitt J., Grbic-Galic D., McCarty P., 1990a. Transformation of carbontetrachloride by *Pseudomonas* sp. strain Kc under denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*; 56, p. 3240-3246
- Criddle C., Dewitt J., McCarty P., 1990b. Reductive dehalogenation of carbon tetrachloride by *Escherichia coli* K12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, p. 3247-3254.
- Cs-Umt-Edu, 2000. Lecture No 26. Chlorinated organics in groundwater. Dept. Geology, University of Montana, USA.  
<http://www.cs.umt.edu/GEOLOGY/classes/Geol431/lectur26.htm>
- Cuypers M.P., Bonten L.T.C., Grotenhuis J.T.C., Rulkens W.H., 1999. Prediction of PAH bioavailability in sediments by persulfate oxidation. CATS 4, Characterisation and treatment of sediments. Editor: G. de Schutter. Antwerpen, Belgium.
- Dablow J., Rodgers D., Morris H., 1997. Steam sparging and enhanced bioremediation for heavy fuel oil remediation. *I In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 5. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*, New Orleans. pp. 439-444.
- Dacyk P., Hughes W., 1999. Induced co-metabolism of chlorinated VOCs using propane. *I Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination*. Leeson och Alleman (Eds.). *The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp.*, San Diego April., p.1-6.
- Davis-Hoover W., Murdoch L., Vesper S., Pahren H., Sprockel O., Chang C., Hussain A., Ritschel W., 1991. Hydraulic Fracturing to Improve Nutrient and Oxygen Delivery for In Situ Bioreclamation; In Hinchee, Olfenbuttel eds., *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, pp 67-82.
- de Bruin W., Kotterman M., Posthumus M., Schraa G., Zehnder A., 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58(6), 1996-2000.
- de Bruin W., Kotterman M., Reinders M., Braam R., Schraa G., Zehnder A., 1994. Poster från Department of Microbiology; Agricultural University, P.O. Box 8033, 6700 E.J. Wageningen, Holland.
- Defibaugh S., Fischman D., 1999. Biodegradation of MTBE utilizing a magnesium peroxide compound: a case study. *Fifth international In situ and on-site bioremediation symposium*. 5(3) editor Alleman B.C. and Leeson A. ISBN:1-57477-076-4.
- Dernbach L., 1999. Failure of non-indigenous microorganisms to remediate petroleum hydrocarbon contaminated sites. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). *The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp.*, San Diego April., p. 415-420.

- Dec J., Bollag J.-M., 1994. Dehalogenation of chlorinated phenols during oxidative coupling. *Environ. Sci. Technol.*, 28, pp. 484-490.
- Diekert, G., 1999. Dehalorespiration. Reductive dechlorination of chlorinated hydrocarbons as a respiratory process in anaerobic bacteria. <http://www.gdiekert.de/sciencefr.htm>
- DiStefano T., Gossett J., Zinder S., 1991. Reductive dechlorination of high concentration of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, p. 2287-2292.
- Dolfing J., 1999. Comment on "methane as a product of chloroethene biodegradation under methanogenic conditions". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, No. 13, pp. 2302-2303.
- Dragun J., 1988. *The Soil Chemistry of Hazardous Materials*. ISBN 0-944989-79-9.
- Eaker C, 1998. Abstract. <http://www.epa.gov/swerosps/bf/bf98/bfbro/cf/biosnabs/eakerc.htm>
- Earth Science 80 E, 1998. Physical/Chemical Properties of Petroleum Hydrocarbons Relating to Groundwater Contamination. <http://wwwcatsic.ucsc.edu/~eart80e/SpecTopics/petroleum.html>
- Ebersson L., 1970. *Organisk Kemi*. Almqvist & Wiksell Förlag AB.
- Ecova, 1990. *Företagsinformation*. Ecova Corporation, Redmond, USA.
- Edwards E., Cox E., 1997. Field and laboratory studies of sequential anaerobic-aerobic chlorinated solvent biodegradation. In *Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 3, p. 261-265. 4:th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., April 97, New Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Edwards, E., Grbic-Galic D., 1992. Complete mineralization of benzene by aquifere microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8):2663-2666.
- Egli C., Scholtz R., Cook A., Liesinger T., 1987. Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp. and *Methanobacterium* sp.. *FEMS Microbiol. Lett.* 43 (3): p 257- 261.
- Egli C., Stromeyer S., Cook A., Leisinger T., 1990. Transformation of tetra- and trichloromethane to CO<sub>2</sub> by anaerobic bacteria is a non-enzymatisk process. *FEMS Microbiol. Lett.* 68:207-212.
- Egli C., Tschan T., Scholtz R., Cook A., Leisinger T., 1988. Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2819-2824.
- Eisenbeis M., Granzow S., Windfuhr C., Scholz-Muramatsu H., 1997. Kinetics of the reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene. In *Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 3, p. 13. 4:th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., April 97, New Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Ellis B., Harold P., Kronberg H., 1991. Bioremediation of a creosote contaminated site. *Environ. Sci. Technol.* 12:447-459.
- Eloskof A., Reisinger J., Belton D., Morley T., 1999. Multi-phase extraction pilot test at the former fire-fighting training facility, Naval Station San Diego. *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 131-136.
- Englert C., Kenzie J., Dragun J., 1993. Bioremediation of petroleum products in soil; i Calabrese E. J., Kostecki P. T. (Eds), *Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils*; Lewis Publishers ISBN 0 87371 394-x .
- EPA/540/S-92/002, Russel H., Matthews J., Sewell G., 1992. TCE removal from contaminated soil and ground water. US EPA, Washington, D.C.
- EPA/540/N-93/001, 1993. Bioremediation in the field; No 8.

- Erzmann M., Pöpel H., 1991. Möglichkeiten und Grenzen der biologischen Elimination von chlorierten Lösungsmitteln aus Abwasser. Gewässerschutz-Wasser-Abwasser, Bd. 125, Aachen.
- Fakta SNV, 2000. <http://www.environ.se/>
- Fathepure B. Z., Boyd S. A., 1988a. Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:12, p. 2980-2986.
- Fathepure B. Z., Boyd S. A., 1988b. Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiol. Letters* 49, p. 149-156
- Fathepure B. Z., Nengu J. P., Boyd S. A., 1987. Anaerobic bacteria that dechlorinated perchloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:11, p. 2671-2674.
- Fennell D., Gossett J., 1999. Comment on "Enrichment of high-rate PCE dechlorination and comparative study of lactate, methanol, and hydrogen as electron donors to sustain activity". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, pp. 2681-2682.
- Fennell D., Gossett J., Zinder S., 1997. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 31, p. 918-926.
- Field J., de Jong E., Feijoo-Costa G., de Bont J., 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH*, February, Vol. 11, p. 44-49. Elsevier Science Publ. Ltd. (UK), 0167-7799/93/.
- Fields K., Zwick T., Leeson A., Wickramanayake G., Doughty H., Sahagun T., 1999. Design, monitoring, and closure strategy for an air sparging site. *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman and Leeson (Eds.). *The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp.*, San Diego April., p. 89-96.
- Fisher T., Newell C., Hughes J., Haas P., Johnson P., 1998. Pulse biosparging of hydrogen for the in-situ biodegradation of chlorinated solvents. *Proceedings. "Environmental Technology: Preserving the Balance" Third Tri-Service Environmental Technology Workshop. 18-20 August 1998 - San Diego, California*  
2001-02-07: <http://aec-www.apgea.army.mil/prod/usaec/et/etw/39.htm>
- Fogel M., Taddeo A., Fogel S., 1986. Biodegradation of chlorinated ethenes by methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 51(4), p. 720-724.
- Freedman D., Gossett J., 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:9, p. 2144-2151.
- Freedman D., Gossett J., 1991. Biodegradation of dichloromethane in fixed-film reactor under methanogenic conditions, in Hinchee R. E., Olfenbittel R. F. (Eds.), *On Site Bioreclamation; Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*. Butterworth-Heinemann, Boston, p. 113-134.
- Galli R., McCarty P. L., 1989. Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane and tetrachloromethane by *Clostridium* sp.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(4), p. 837-844.
- Gibson D., Subramanian V., 1984. *Microbial degradation of organic compounds*. Microbiology Series, vol. 13; ed. Gibson. ISBN 0-8247-7970-3. Dekker Inc.
- Goltz M., Hopkins G., Allan J., Dolan M., McCarty P., 1997. Full-scale demonstration of in-situ aerobic co-metabolism of trichloroethylene-contaminated groundwater. *In Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 3, p. 71. 4th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., April 97, New Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Goswami P., Singh D., 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol. and Bioeng.*, Vol. 37, pp. 1-11

- Graves R., Hinchee R., Jensen T., Graves A., Wiedemeier T., Weller M., Elliot R., 1997. Natural attenuation of chlorinated compounds in six plumes at Hill AFB. In *Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 3, p. 141-145. 4:th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., April 97, New Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Grbic-Galic D., Vogel T.M. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2):254-260.
- Grindstaff M., 1998. Bioremediation of chlorinated solvent contaminated groundwater. Prepared for U.S. EPA Technology Innovation Office under a National Network of Environmental Management Studies Fellowship. <http://207.86.51.66/products/intern/bioremed.htm>
- Griffin W., Traxler R., 1981. Some aspects of hydrocarbon metabolism by *Pseudomonas*. *Dev. Ind. Microbiol.*, 22: pp. 425-435.
- Grishchenkov V., Townsend R., McDonald T., Autenrieth R., Bonner J., Boronin A., 1999. Degradation of hydrocarbons in crude oil by pure bacterial cultures under different redox conditions. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 209-214.
- Grosse S., Laramée L., Wendlandt K.-D., McDonald I., Miguez C., Kleber H.-P., 1999. Purification and characterization of the soluble methane monooxygenase of the type II methanotrophic bacterium *Methylocystis* sp. strain WI 14. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 65, No. 9, pp. 3929-3935.
- Grosser R., Warshawsky D., Vestal R., 1991. Indigenous and enhanced mineralisation of pyrene, benzo[a]pyrene and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57. p. 3462-3469.
- Groundwater Services, Inc., 1997. Bioscreen. Natural attenuation. Decision support system, Version 1.4, 1997. Prepared for Air Force Centre for Environmental Excellence (AFCEE) Technology Transfer Division; Brooks Air Force Base, USA.
- Guengerich F., Crawford Jr., Watanabe P., 1979. Activation of vinyl chloride to covalently bound metabolites: roles of 2-chloroethylene oxide and 2-chloroacetaldehyde. *Biochemistry* 18:5177-5182.
- Gustafson, J., Tell J., Orem D., 1996. Selection of representative TPH fractions based on fate and transport considerations. TPH Criteria Working Group. Fate and Transport Technical Action Group. Vol. III in a series. TPHCWG Fate and Transport Final Draft 6/26/1996. Amherst Scientific Publishing.
- Haeseler F., Blanchet D., Druelle V., Werner P., Vandecasteele J-P. 1999. Ecotoxicological assessment of soils of former manufactured gas plant sites: Bioremediation potential and pollutant mobility. *Environ. Sci. Technol.* Vol 33. 24:4379-4384.
- Hammond, M., Alexander, M., 1972. Effect of chemical structure on microbial degradation of methyl substituted aliphatic acids. *Environ Sci Technol.* vol. 6, s. 732-735.
- Hanboken Bygg, Geoteknik (1984): Grundvattensänkning, kapitel G11:42.
- Hardman D., 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Critical Rev. Biotechnol* 11(1), p. 1-40.
- Hardy L., Moeri E., Salvador M., 1999. Rapid intrinsic degradation of chlorinated solvents at a manufacturing site in Brazil. *I Natural Attenuation of Chlorinated Solvents, Petroleum Hydrocarbons, and other Organic Compounds*. Alleman, Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.19-28.
- Harker A., Kim Y., Matrubutham U., 1994. Application of genetic engineering to the field of bioremediation. i Wise D., Trantolo D., (eds.), *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils*. ISBN 0-8247-9160-6.

- Harvey R., Kinner N., Bunn A., McDonald D., Metge D., 1995. Transport behavior of ground water Protozoa and protozoan-sized microspheres in sandy aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, no. 1, pp. 209-217
- Harris S., 2000. Hydrocarbon Bioremediation. MCB290. [http://bark214-3.berkeley.edu/MCB290/hydrocarbon\\_bioremediation.htm](http://bark214-3.berkeley.edu/MCB290/hydrocarbon_bioremediation.htm) (2000-12-07)
- Hartley J., Furlow L., Zwiren W., 1999. Cycled air sparging: Field results in a high-velocity aquifer. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 77-81.
- Harvey R., 1991. Parameters involved in modeling movement of bacteria in groundwater. In *Modeling the Environmental fate of Microorganisms*, Hurst C (ed.). American Soc. for Microbiol., Washington D.C., pp. 89-114
- Henson J., Yates M., Cochran J., Shackelford D., 1988. Microbial removal of halogenated methanes, ethanes and ethylenes in an aerobic soil exposed to methane. *FEMS, Microb. Ecol.* 53, p.193-201.
- Hinchee R., Downey D., Aggarwal P., 1991. Use of hydrogen peroxide as an oxygen source for *in situ* biodegradation. *J. Hazardous Materials*. Vol. 27, p. 287-299.
- Ho, Y., Yang Y., Pritchard P., 1995. Classification of PAH-degrading bacteria by PAH utilization patterns and the comparison of metabolic products. I: Eighth Int. IGT Symp. on Gas, Oil and Environmental Biotechnology. Dec. 11.13, 1995. Colorado. IGT, IL, 18 p. (ERL; GB; X912).  
<http://www.epa.gov/gbwebdev/ged/publica/c3926.htm>
- Holliger C., 1992. Reductive dehalogenation by anaerobic bacteria. Doktorsavhandling, van de Landbouwniversiteit, Wageningen.
- Holliger C., Schraa G., Stams A., Zehnder A., 1993. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59(9), p. 2991-2997
- Holliger C., Wohlfarth G., Diekert G., 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbil. Rev.*, 22, pp. 383-398.  
<http://www.gdiekert.de/sciencefr.htm>
- Holliger C., Zehnder A., 1996. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 7, pp. 326-330.
- Hopkins G., McCarty P., 1995. Field evaluation of *in situ* aerobic co-metabolism of trichloroethylene and three dichloroethylene isomers using phenol and toluene as the primary substrates. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 29, pp. 1628-1637.
- Hou, C. T., Patel P., Laskin A., Barnabe N., 1979. Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: epoxidation of C2 till C4 n-alkenes by methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:127-134.
- Houck C., Morin T., Jones A., Palagyi T., 1999. Dual-phase extraction and bioventing of petroleum-contaminated soils and ground water at gasoline station No. 63-232-0049, Seattle, Washington. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 137-142.
- Hughes J., Parkin G., 1991. The effect of electron donor concentration on the biotransformation of chlorinated aliphatics. i Hinchee R. E., Olfenbuttel R. F. (Eds.), *On Site Bioreclamation; Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*. Butterworth-Heinemann, Boston, p. 59-76.
- Huesemann M., 1995. Predictive Model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils, *Environ. Sci. Technol.*, Vol 29, nr 1, s 7-18.

- Hunkeler D., Jörger D., Häberli K., Höhener P., Zeyer J., 1998. Petroleum hydrocarbon mineralization in anaerobic laboratory aquifer columns. *J. Contam. Hydrol.*, vol. 32, pp. 41-61.
- Iacondini A., Abbondanzi F., Malasina F., Gagni S., Carnevali M., Hannula H., Serra R., 1999. Studies of in situ bioremediation of an aquifer polluted by toluene. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 65-70.
- INET, 1993. In situ and on-site bioremediation. International Network for Environmental Training, Maryland, USA.
- In Situ Bioremediation. When does it work?, 1993. National Research Council. ISBN 0-309-04896-6.
- Kaplan D., Kaplan A., 1982. Thermophilic biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene under simulated composting conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 44. pp. 757-760.
- Kastner J., Domingo J., Denham M., Molina M., Brigmon R., 1999. Effect of fentons reagent on subsurface microbiology and biodegradation capacity. *I Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination*. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.191-198.
- Kayser K., Srivastava V., Kilbane II J., Hayes T., Golchin T., Nelson G., Shipley S., 1997. Evaluation of in situ foam extraction of polyaromatic hydrocarbons from contaminated soil. *I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 3*. Fouth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 487-492. ISBN 1-57477-028-4.
- Keck J., Sims R., Coover M., Park K., Symons B., 1989. Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Wat. Res. Vol.* 23, no. 12, 1467-1476.
- Kelsey J.W., Kottler B.D., Alexander M. 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31(1):214-217.
- Khindaria A., Grover T., Aust S., 1995. Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 29, pp. 719-725.
- Kinner N., Harvey R., Blakeslee K., Novarino G., Meeker L., 1998. Size-selective predation on groundwater bacteria by nanoflagellates in an organic-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no 2, pp.618-625.
- Kislenko V.N., Berlin A.A., Litovchenko N.V. 1996. Kinetics of the oxidation of organic substances by persulfate in the presence of variable-valence metal ions. *Kin. Cat.* 37(6):767-774.
- Klecka G., Gonsior S., Markham D., 1990. Biological transformations of 1,1,1-trichloroethane in subsurface soils and ground water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, p. 1437-1451.
- Kleopfer R., Easley D., Haas B. Jr., Delhl T., Jackson D., Wurrey C., 1985. Anaerobic degradation of trichloroethylene in soil. *Envir. Sci. Technol.*, 19:3, p. 277- 280.
- Kniemeyer O., Probian C., Rosello-Mora R., Harder J., 1999. Anaerobic mineralization of quarternary carbon atoms: I solution of denitrifying bacteria on dimethylmalonate. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 8, pp. 3319-3324.
- Knox R., Canter L., 1996. Prioritization of ground water contaminants and sources. *Water, Air and Soil pollution*, vol. 88 p. 205-226.



- Koenigsberg S., Farone W., 1999. The use of hydrogen release compound (HRC<sup>TM</sup>) for CAH bioremediation. I Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.67-72.
- Kraus J., Nelson S., Boersma P., Maciey A., 1997. Comparison of pre-/post-sparging VOC concentrations in soil and groundwater. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 1. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 123-128. ISBN 1-57477-026-8.
- Krumholz L., Sharp R., Fishbain S., 1996. Appl. Environ. Microbiol., vol. 62(11), 4108-4113.
- Laha S., Luthy R., 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. Environ. Sci. Technol., Vol. 25, No. 11, pp. 1920- 1930.
- Lanzarone N., McCarty P., 1990. Column studies on methanotrophic degradation of trichloroethylene and 1,2-dichloroethane. Ground Water, Vol. 28, pp. 910-919.
- Larsson L., 1998. Jordens renhållningsarbetare till Er tjänst: Naturlig självrening av petroleumprodukter. Bygg & Teknik, nr 1, 1998, pp. 28-30.
- Larsson L., Forsman M., Lindmark P., 1994. Biologiska metoder för sanering av förorenade markområden. AFR-Rapport 55. Avfallsforskningsrådet.
- Leahy M., Brown R., 1994. Bioremediation: optimizing results. Chemical Engineering; May, Vol. 101, No. 5, pp. 108-116.
- Leahy M., Brown R., 1994. Bioremediation: optimizing results. Chemical Engineering; May, Vol. 101, No. 5, pp. 108-116.
- Leahy M., Nelson C., Fiorentine A., Schmitz R., 1997. Ozonation as a polish technology for in situ bioremediation. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 3. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 479-483. ISBN 1-57477-028-4.
- Leisinger T., Braus-Stromeyer S., 1995. Bacterial growth with chlorinated methanes. Environmental Health Perspectives, Vol. 103, Suppl. 5, June 1995.  
<http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/1995/103-S5/leisinger-abs.html>
- Leuschner A., Moeller M., Gerrish J., Johnson L., Rajan R., Seybold A., Hickey R., 1997. Case study: MGP site remediation using enhanced DNAPL recovery. I Hazardous Waste and Environmental management in the Gas Industry – Institute of Gas Technology (IGT) Symposium, Albuquerque, NM.  
<http://igtgasline.org/abstracts/1997/97-1262.html>  
<http://www.sgcleanup.com/gw/hot.html>
- Lew D., Bouwer E., 1988. Anoxic biotransformations of halogenated aliphatic micropollutants. Proc. Water Pollution Control Federation Conf.; Water Pollution Control Federation. Washington D.C.
- Lien H.-L., Zhang W.-x., 1999. Transformation of chlorinated methanes by nanoscale iron particles. J. Environ. Engineering, Nov. 1999, pp. 1042-1047.
- Lindmark, P., Larsson, L. B., 1995. Åtgärdsteknik för oljeförorenad mark. Metoder för efterbehandling och sanering. Naturvårdsverket. SNV Rapport 4445.
- Litchfield C., 1993. In situ bioremediation: Basis and practices. i Levin M., Gealt M., (eds). Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste. ISBN 0-07-037554-2.
- Little C., Palumbo A., Herbes S., Lidstrom M., Tyndall R., Gilmer P., 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 54, p. 951.
- Logan B., Camesano T., Rogers B., Fang Y., 1997. Enhancing biocolloid transport to improve subsurface remediation. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 4. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 567-572. ISBN 1-57477-029-2.

- Long J., Stensel H., Ferguson J., Strand S., Ongerth J., 1993. Anaerobic and aerobic treatment of chlorinated aliphatic compounds. EPA, Cincinnati OH (USA), RREL. EPA/600/J93/438.
- Ludvigsen L., Kiilerich O., Broholm K., Deigaard L., 1999. Aerobic biodegradation of vinyl chloride and cis-1,2-dichloroethylene: laboratory and field studies. I Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.81-87.
- MacDonald T., Kitanidis P., McCarty P., Roberts P., 1999a. Mass-transfer limitations for macroscale bioremediation modeling and implications on aquifer clogging. *Ground Water*, vol. 37, no. 4, pp. 523-531.
- MacDonald T., Kitanidis P., McCarty P., Roberts P., 1999b. Effects of shear detachment on biomass growth and in situ bioremediation. *Ground Water*, vol. 37, no. 4, pp. 555-563.
- Mahaffey W., Gibson D., Cerniglia C., 1988. Bacterial oxidation of chemical carcinogens: Formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54, No 10, p 2415-2423.
- Mahaffey W., Gardner J., Mickel C., Andrews S., Santangelo-Dreiling T., 1999. Evaluation of in situ biodegradation of chlorinated solvents in a fractured bedrock aquifer. I Natural Attenuation of Chlorinated Solvents, Petroleum Hydrocarbons, and other Organic Compounds. Alleman, Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April. Battelle Press. p. 71-76.
- Malusis M., Adams D., Reardon K., Shackelford C., Mosteller D., Bourquin A., 1997. Microbial transport in a pilot-scale biological treatment zone. I *In Situ and On-Site Bioremediation*; Volume 4. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 559-564. ISBN 1-57477-029-2.
- Marquez-Rocha F., Hernandez-Rodriguez V., Vazquez-Duhalt R., 1999. Diesel removal from a contaminated soil by natural hydrocarbon-degrading microorganisms. I *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 409-414.
- Matheson L., Tratnyek P., 1994. Reductive dehalogenation of chlorinated methanes by iron metal. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 28, pp. 2045-2053.
- McCarty P., 1997. Breathing with chlorinated solvents. *Science*, v. 276, p. 1521-1522.
- McClellan R., Gilham R., 1992. Vapour extraction of trichloroethylene under controlled conditions at the Borden site. I K. Weyer (Ed.): *Subsurface Contamination by Immiscible Fluids*. pp. 89-96. A:A: Bakema, Rotterdam.
- McFarland M., Qiu X., Sims J., Randolph M., Sims R., 1992. Remediation of petroleum impacted soils in fungal compost bioreactors. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 25, No. 3, p. 197-206.
- Mercer J., Ford R., Stitz J., Bradbeer C., 1993. Growth rate and effects on fundamental transport properties of bacterial populations. *Biotechnol. Bioengin.* Vol. 42, pp. 1277-1286.
- Middeldorp P., et. Al., 1999. Anaerobic microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes. *Biorem. J.*, 3(3), pp. 151-169.
- Miljöteknikdelegationen, 2000. <http://miljoteknik.nutek.se/>
- Miller R., Guengerich F., 1982. Oxidation of TCE by liver microsomal cytochrome P-450: evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide. *Biochemistry* 21: p. 1090-1097.

- Montgomery M., Boyd T., Spargo B., Coffin R., Mueller J., 1997. Bacterial productivity in BTEX- and PAH-contaminated aquifers. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 4. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 125-130. ISBN 1-57477-029-2.
- Moore S., 1993. Bioremediation will debut in Japan. Chemical Engineering, May, p. 50.
- Morikawa M., Kanemoto M., Imanaka T., 1996. Biological oxidation of alkane to alkene under anaerobic conditions. J. Ferment. Bioeng., vol. 82, no. 3, pp. 309-311.  
<http://kogaku.kyoto-u.ac.jp/1996/B/SC/96BSC34008.html>  
<http://koken-db.kogaku.kyoto-u.ac.jp/1996/B/SC/96BSC34008.html>  
<http://lib1.nippon-foundation.or.jp/1997/1146/contents/091.htm>
- Morgan, P., Watkinson, R., 1994. Biodegradation of components of petroleum. I: C. Ratledge, ed. Biochemistry of Microbial Degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. s. 1-31.
- Moutoux D., Benson L., Hicks J., Wiedemeier T., Swanson M., Wilson J., Kambell D., Hansen J., 1997. Patterns of reductive dehalogenation of dissolved chlorinated hydrocarbon plumes. In Situ and On-Site Bioremediation, vol. 3, p. 191-196. 4:th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., April 97, New Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Mueller J., 1997. In situ management system employing integrated funnel-and-gate/GZB containment and recovery technologies. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 4. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 149-154. ISBN 1-57477-029-2.
- Müller R., Lingens F., 1987. Mechanismen der mikrobiellen dehalogenierung von chlorkohlwasserstoffen. GIT Supplement 5/87, Umwelt II. p. 4-9.
- Mulder G., van Ree C., Vreeken C., 1999. Prediction and field testing radius of influence for biosparging. I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 103-108.
- Møller J., Gaam H., Steckel T., Wedeby E., Westermann P., 1995. Inhibitory effects on degradation of diesel oil in soil-microcosms by a commercial bioaugmentation product. Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 54, pp. 913-918
- Nakajima, K., Sato, A., Takahara, Y., Iida, T., 1985. Microbial oxidation of isoprenoid alkanes, phytane, norpristane and farnesane. Agric. Biol. Chem. 49: s. 1993-2002.
- Nakles, D.V., Roose, T.R., Hayes, T.D. 1997: Alternative approaches for the determination of environmentally acceptable endpoints (EAEs) for contaminants in soil. Society of Petroleum Engineers, SPE 37918.
- Natural Attenuation 1998. Natural Attenuation: Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Third vol. in the six volume set from The 1998 First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds Monterey, CA May 18-21. Battelle Press.
- Natural Attenuation 1999. Natural attenuation of Chlorinated Solvents, Petroleum Hydrocarbons, and other Organic Compounds. Alleman, Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April. Battelle Press.
- Naturvårdsverket. 1998. Organiska Miljögifter. ISBN:91-620-1188-X.
- Nélieu S., Kerhoas L., Einhorn J. 2000. Degradation of antrazine into ammeline by combined ozone/hydrogen peroxide treatment in water. Environ, Sci, Technol. 34:430-437.
- Nelson C., Barker C., 1999. Treatment of TCE-impacted groundwater using in situ chemical oxidation. I Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.199-204.

- Nelson C., Seaman M., Peterson D., Nelson S., Buschbom R., 1997. Ozone sparging for remediation of MGP contaminants. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 3. Fouth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 457-462. ISBN 1-57477-028-4.
- Nelson M., Bourquin A., 1990. U.S. Patent 4,925,802. Ecova Corporation, Redmond, WA
- Nelson M., Kinsella J., Montoya T., 1990. In situ biodegradation of TCE contaminated groundwater. Environ. Prog., Vol. 9, p. 190-196.
- Nelson M., Montgomery S., Mahaffey W., Pritchard P., 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. Appl. Environ. Microbiol. 53(5), p. 949-954.
- Nelson M., Montgomery S., Pritchard P., 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 54:2, p. 604-606.
- Newberg S., Warikoo V., Sharma P., McCarty P., 1997. Bioaugmentation with strain MS-1 for tetrachloroethene anaerobic biotransformation to cis-1,2-dichloroethene. In Situ and On-Site Bioremediation , vol. 3, p. 1. 4:th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., April 97, New Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Noordman W., Ji W., Brusseau M., Janssen D., 1997. Biosurfactant-enhanced removal of phenanthrene from soil. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 2. Fouth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 597-601. ISBN 1-57477-027-6
- Norris R.D. 1994. In-situ bioremediation of soils and ground water contaminated with petroleum hydrocarbons. In: Bioremediation of ground water and geological material. Editor Kerr R.S. ISBN:0-86587-404-2.
- Notiser om Miljöteknik från Sveriges Attachéer, 1994:4.
- OECD Environment Directorate, 1994. The identification of possible impediments to the diffusion and deployment of bioremediation technologies.
- Palumbo A., Strong-Gunderson Carroll S., 2000. Retaining enzyme activity during degradation of TCE by Methylotherophiles. Oak Ridge Laboratory, Tennessee.  
<http://www.esd.ornl.gov/programs/microbes/migrpabs.html>
- Pankow J., Cherry J., 1996. Dense chlorinated solvents and other DNAPLs in ground-water. Waterloo Press, Portland.
- Pardiek D., Bouwer E., Stone A., 1992. Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers: A review. J. Contaminant Hydrology, Vol. 9, p. 221-242.
- Parker T., Mohr T., 1996. Symposium on natural attenuation of chlorinated solvents in ground-water – A summary. <http://www.grac.org/winter96/rnapaper.htm>
- Parsons F., Barrio-Lage G., 1985. Chlorinated organics in stimulated groundwater environments. J. Am. Water Works Assoc., 71, p 52-59
- Parsons F., Barrio-Lage G., Rice R., 1985. Biotransformation of chlorinated organic solvents in static microcosms. Envir. Toxicology and Chemistry, 4(6), p. 739-742.
- Parsons F., Wood P., DeMarco J., 1984. Transformation of tetrachloroethylene and trichloroethylene in microcosms and groundwater. J. Am. Water Works Assoc., 76(2), p 56-59.
- Pas B. van de, 2000. Bioenergetics of anaerobic bacteria that use chlorinated compounds as terminal electron acceptor for growth. <http://www.spb.wau.nl/micr/mf-tit02.htm>
- Prince R., m. fl., 1999. Bioremediation of a marine oil spill in the arctic. I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 227-232.

- Rajan R., Hayes T., 1997. MGP groundwater treatment with high-rate fixed-film biological systems. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 3. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 451-456. ISBN 1-57477-028-4.
- Rasche M., Hicks R., Hyman M., Arp D., 1990a. Oxidation of monohalogenated ethanes and n-chlorinated alkanes by whole cells of *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriology*, vol. 172, no. 9, pp. 5368-5373.
- Rasche M., Hyman M., Arp D., 1990b. Biodegradation of halogenated hydrocarbon fumigants by nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 56, pp. 2568-2571.
- Ravikumar J., Gurol M., 1994. Chemical oxidation of chlorinated organics by hydrogen peroxide in the presence of sand. *Environ. Sci. Technol.*, 28, p. 390-400.
- Reeter C., Gavaskar A., Gupta N., Sass B., 1998. Evaluating the performance of a permeable reactive barrier. Moffett Field, Mountain View, California. Proceedings. "Environmental Technology: Preserving the Balance" Third Tri-Service Environmental Technology Workshop. 18-20 August 1998 - San Diego, California. 2000-02-07: <http://aec-www.apgea.army.mil/prod/usaec/et/etw/12.htm>
- Reinhard M., 1994. In-situ bioremediation technologies for petroleum-derived hydrocarbons based on alternate electron acceptors (others than molecular oxygen). In: *Bioremediation of ground water and geological material*. Editor Kerr R.S. p7-1: 7-17. ISBN:0-86587-404-2.
- Ripley M., Harrison A., Betts B., Dart K., Wilson A., 2000. Enhanced degradation of a model oil compound in soil using a liquid foam-microbe formulation. *Environ. Sci. Technol.*, vol.34, no. 3, pp. 489-496
- Rittmann B., Valocchi A., Odencrantz J., Bae W., 1988. In situ bioreclamation of contaminated groundwater. Illinois Hazardous Waste Research and Information center, HWRIC RR 031.121, Chicago.
- Roberts P., Semprini L., Hopkins G., Grbic´-Galic´ D., McCarty P., Reinhard M., 1989. In Situ Aquifer Restoration of Chlorinated Aliphatics by Methanotrophic Bacteria, USEPA, Kerr, R.S. ERL, Ada, Okla., EPA/600/2-89/033.
- Rosenberg E., 1986. Microbial surfactants. *CRC Critical Rev. in Biotechnol.*, Vol. 3, Issue 2, p. 109-132.
- Saberian A., Schmid H., Spadaro J., Kuiper J., 1997. Comparison of PCE biodegradation rate under natural versus enhanced conditions. In *Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 3, p. 241-246. 4:th Int. In Situ and On-Site Biorem. Symp., Apr. 97, N. Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Salanitro J., Johnson P., Spinnler G., maner P., Wisniewski H., Bruce C., 2000. Field-scale demonstration of enhanced MTBE bioremediation through quifer Bioaugmentation and oxygenation. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 19, pp. 4152-4162.
- Sanglard D., Leisola M., Fiechter A., 1986. Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo(a)pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, p. 209-212
- Santas P., Santas R., 1994. Status of sea-borne bioremediation technologies. i Wise D., Trantolo D., (eds.), *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils*. ISBN 0-8247-9160-6.
- Schaffner I., Wieck J., Lamb S., 1998. Enhanced reductive dehalogenation of chlorinated aliphatic hydrocarbons at a former wastewater treatment facility: a microcosm study. In proceedings, Northeast Focus Ground Water Conference, national Ground Water Assoc., p. 115-125. <http://biogroup.gzea.com/bioreferences/tier1papers/Microcosm.asp>
- Schwarzenbach R., Gschwend P., Imboden D., 1993. *Environmental organic chemistry*, ISBN 0-471-83941-8.

- Semprini L., Hopkins G., McCarty P., Roberts P., 1992. In situ biotransformation of carbon-tetrachloride and other halogenated compounds resulting from biostimulation under anoxic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 26, p. 2454-2461.
- Semprini L., Hopkins G., Roberts P., McCarty P., 1991. In situ biotransformation of carbon-tetrachloride, freon-113, freon-11 and 1,1,1-TCA under anoxic conditions. i Hinchee R. E., Olfenbuttel R. F. (Eds.), *On Site Bioreclamation; Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*. Butterworth-Heinemann, Boston, p. 41-58.
- Seubert W., Fass E., 1964. Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. V. Der Mechanismus des Isoprenoid-Abbaues. *Biochemistry Zeitung* 341, s. 35-44.
- Sheldon J., Koenigsberg S., Quinn K., Sandefur C., 1999. Field application of lactic acid ester for PCE bioremediation. I *Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination*. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 61-66.
- Shigeaki Harayama, Hideo Kishira, Yuki Kasai, Kazuaki Shutsubo, 1999. Petroleum Biodegradation in Marine Environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1), s. 63-70. <http://jmmb.net/v1n1/10/10.html>
- Shigematsu T., Hanada S., Eguchi M., Kamagata Y., Kanagawa T., Kurane R., 1999. Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading methylo-monas sp. strains and detection of methanotrophs during in situ bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 65, No. 12, pp. 5198-5206.
- Shimomura T., Shinmura H., Seki N., 1999. Accelerated reductive dichlorination of PCE: A full-scale soil treatment. I *Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination*. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.129-134.
- Slenders H. m. fl., 1999. Bioremediation of chlorinated solvents in peat and natural attenuation of plume. I *Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination*. Leeson och Alleman (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p.141-146.
- Slope-analysis, 2000. <http://www.slope-analysis.com/inbios1.htm>
- Smatlak C., Gossett J., Zinder S., 1996. Comparative kinetics of hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethene and methanogenesis in an anaerobic enrichment culture. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 30, pp. 2850-2858.
- SNV Rapport 4393, 1995. Branschkartläggningen - En översiktlig kartläggning av efterbehandlingsbehovet i Sverige. Naturvårdsverket.
- SNV, 1995. Handlingsprogram för efterbehandling 1995. Naturvårdsverket 1995-09-01.
- SNV Rapport 4318, 1994, Inför ett långsiktigt saneringsarbete. Naturvårdsverket.
- SNV, 1993. Efterbehandling. Erfarenheter från genomförda projekt. Biologisk behandling av PAH-förorenad jord. SNV 9502-1/93-09.
- So, C., Young L., 1999a. Initial reactions for anaerobic alkane degradation by the sulfate reducer strain AK-01. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5532-5540.
- So, C., Young L., 1999b. Anaerobic degradation of alkanes by a sulfate-reducing bacterium: isolation and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2969-2976.
- Spangord R.J. Yao D., Mill T., 2000a. Kinetics of aminodinitrotoluen oxidations with ozone and hydroxyl radical. *Environ. Sci. Technol.* 34:450-454.
- Spangord R.J. Yao D., Mill T., 2000b. Oxidation of aminodinitrotoluen oxidations with ozone: Products and pathways. *Environ. Sci. Technol.* 34:497-504.
- Speitel G., Leonard J., 1992. A sequencing biofilm reactor for the treatment of chlorinated solvents using methanotrophs. *Water Environ. Res.*, Vol. 64, p. 712-719.
- Strand S. E., Shippert L., 1986. Oxidation of chloroform in an aerobic soil exposed to natural gas. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(1); p. 203-205.

- Stoner D., 1994. Hazardous organic waste amenable to biological treatment. i Stoner D. (ed.), *Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste*. p. 1-25. CRC press. Inc. Boca Raton, Florida.
- Suflita J., Horowitz A., Shelton D., Tiedje J., 1982. Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science*, 218, Dec. p. 1115-1117.
- Sundaresan A., Ernest A., Bonner, J., McDonald, T., Bosquez, A., 1997. Bioremediation of Arabian Light Crude Oil in Wetland Microcosms. AIChE's (American Institute of Chemical Engineers) 1997 Annual Meeting Nov. 16-21, L. A., CA  
<http://www1.che.ufl.edu/meeting/1997/annual/session/187/al/>
- Sutherland J. B., Selby A. L., Freeman J. P., Evans F. E., Cerniglia C. E., 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, p. 3310-3316.
- Swadley L., Munakata-Marr J., Mahaffey W., 1999. Bioaugmentation for trichloroethylene remediation: Wild type and constitutive mutant strains. I Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination. Leeson och Alleman (Eds.). *The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp.*, San Diego April, p.293-297.
- Swannell P., Head I., 1994. Bioremediation comes of age. *Nature*, Vol. 368, s. 396.
- Télléz C., Gaus K., Graham D., Arnold R., Guzman R., 1998. Isolation of copper biochelates from *Methylosinus trichosporium* OB3b and soluble methane monooxygenase mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, No. 3, pp. 1115-1122.
- Testa, S.M. och Winegardner (1991): *Restoration of Petroleum Contaminated Aquifers*. Lewis Publishers.
- Thomas J., Ward C., 1991. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 23, p. 760-766.
- Thomsen B.A., Henriksen K., Grøn C. and Møldrup P. 1999. Sorption, transport and degradation of quinoline in unsaturated soil. *Environ. Sci. Technol.* 33:2891-2898.
- Tovanabootr A., Russel S., Stoffers N., Arp D., Semprini L., 1997. An evaluation of five aerobic co-metabolic substrates for trichloroethylene treatment by microbes stimulated from the subsurface of McCellan Air Force base. *In Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 3, p. 93-99. 4:th Int. *In Situ and On-Site Biorem. Symp.*, Apr. 97, N. Orleans. ISBN 1-57477-028-4.
- Trudgill P., 1984. Microbial degradation of alicyclic ring. I Gibson D. (ed.), *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Mew York, Marcel Dekker.
- Tulis D., 1997. Issues associated with natural attenuation. US EPA.  
<http://www.epa.gov/swerust1/rbdm/issues.htm>
- US Army Corps, 1999. Engineering and Design - Multi-Phase Extraction. Engineer Manual 1110-1-4010.  
<http://www.usace.army.mil/inet/usace-docs/eng-manuals/em1110-1-4010/toc.htm>
- US Army Corps, 1997. Engineer Manual 1110-1-4005.  
<http://www.usace.army.mil/inet/usace-docs/eng-manuals/em1110-1-4005/toc.htm>
- US Army Corps, 1995. Engineering and Design - Soil Vapor Extraction and Bioventing. Engineer Manual 1110-1-4001  
<http://www.usace.army.mil/inet/usace-docs/eng-manuals/em1110-1-4001/toc.htm>
- US EPA, 1995a. Manual. Volume I. Bioventing principles.  
<http://www.epa.gov/ORD/WebPubs/biorem/ibiov.pdf>
- US EPA, 1995b. Manual. Volume II. Bioventing design.  
<http://www.epa.gov/ORD/WebPubs/biorem/iibiov.pdf>
- US EPA, 1998. EPA seeks comments on changes to cleanup plan at Moss-American site.  
<http://www.epa.gov/reg5oopa/news98/98opa059.htm>

- US EPA, 1999. Treatment and derstruction branch. [http://www.epa.gov/ordntrnt/ORD/NRMRL/Irpcd/tdb/Research-Programs\\_files/MTBE\\_research.htm](http://www.epa.gov/ordntrnt/ORD/NRMRL/Irpcd/tdb/Research-Programs_files/MTBE_research.htm)
- US EPA, 2000a. Ground-water circulation well systems. <http://www.epa.gov/swertio1/products/moreinfo/isgwcirc.htm>
- US EPA, 2000b. Bioventing. <http://www.epa.gov/swerust1/cat/biovent.htm>
- US EPA, 2000c. Pneumatic fracturing. <http://www.epa.gov/swertio1/products/moreinfo/ispneu.htm>
- US EPA, 2000d. Hydraulic fracturing. <http://www.epa.gov/swertio1/products/moreinfo/ishydro.htm>
- US EPA 2000e. Water permeable treatment walls. <http://www.epa.gov/swertio1/products/moreinfo/istrtwl.htm>
- US EPA 2000f. In situ solvent flushing. <http://www.epa.gov/swertio1/products/moreinfo/issurfac.htm>
- US EPA 2000g. Citizen guide. What is in situ soil flushing? <http://www.epa.gov/swertio1/products/citguide/soilflsh.htm>
- US EPA 2000h. soil vapor extraction (SVE). <http://www.epa.gov/swerust1/cat/sve1.htm>
- US EPA 2000i. A Citizen's Guide to Soil Vapor Extraction and Air Sparging <http://www.epa.gov/swertio1/products/citguide/sve.htm>
- Wackett L., Brusseau G., Householder S., Hanson R., 1989. Survey of microbial oxygenases: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(11), p. 2960-2964.
- Wackett L., Gibson D., 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(7), p. 1703-1708.
- Waltz M., Ricotta A., 1997. In situ hydrocarbon remediation in clay using bioslurry injection and bioventing. *I In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 5. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, New Orleans.* pp. 489-493.
- van Beelen P., van Keulen F., 1990. The kinetics of the degradation of chloroform and benzene in anaerobic sediment from river Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24: p. 13-21
- Wang X., Yu X., Bartha R., 1990. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 24, p. 1086-1089.
- van Hylckama Vlieg J., 1999. Reaktive epoxides as intermediates in the bacterial metabolism of isoprene and chlorinated ethenes. *Proefschrift. Rijksuniversiteit Groningen.* ISBN: 90-367-1028-6.
- van Ree C., Kolkman X., Marnette E., 1999. Protocol for the assessment of in situ respiration rates. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds.* Alleman och Leeson (Eds.). *The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April.*, p. 109-114.
- Watson J., Jones D., Swannell R., 1999. Formation of carboxylic acids during bioremediation of crude oil. *I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds.* Alleman och Leeson (Eds.). *The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April.*, p. 251-255.
- Weissenfels W., Klewer H.-J., Langhoff J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 36, p. 689-696.
- Ventkatraman S., Schuring J., Boland T., Bossert I., Massry I., Kosson D., 1997. Pneumatic fracturing enhanced in-situ bioremediation: Field demonstration and system modeling. *I In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 5. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, New Orleans.* pp. 495-504.



- Verschuere K., 1983. Handbook of environmental data on organic chemicals, 2nd ed., Van Nostrand Reinhold Co. NY.
- Westervelt W., Lawson P., Wallace M., Fosbrook C., 1997. Intrinsic remediation of arctic diesel fuel near drinking water wells. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 1. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 61-66. ISBN 1-57477-026-8.
- Whyte L., Bourbonniere L., Greer C., 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 9, pp. 3719-3723.
- Whyte L., Hawari J., Zhou E., Bourbonniere L., Inniss W., Greer C., 1998. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 7, pp. 2578-2584.
- Wild S., Jones K., 1993. Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environ. Toxic. Chem.*, Vol. 12, p. 5-12.
- Willumsen P., Arvin E., 1999. Kinetics of degradation of surfactant-solubilized Fluoranthene by a *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, no. 15, pp. 2571-2578.
- Wilson A., Betts B., 1997. A novel liquid foam carrier for use in bioremediation. I In Situ and On-Site Bioremediation; Volume 4. Fourth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., New Orleans, pp. 125-130. ISBN 1-57477-029-2.
- Wilson J., Wilson B., 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: p. 242-243.
- Visscher K., Brinkman J., 1989. Biological Degradation of Xenobiotics in Waste Management. *Haz. Waste Haz. Mater.* Vol. 6, No. 2 p. 201-212.
- Witt M., Dybas M., Worden R., Criddle C., 1999. Motility-enhanced bioremediation of carbon tetrachloride-contaminated aquifer sediments. *Environ. Sci. Technol.*, vol 33, pp. 2958-2964.
- Woodward D., Niederreither M., McMonagle T., 1999. An evaluation of alternative vacuum systems for implementing bioslurping. I In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 143-148.
- Vogel T., Criddle C., McCarty P., 1987. Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 21, p 722-736.
- Vogel T., Grbic-Galic D., 1986. Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(1), p 200-202.
- Vogel T., McCarty P., 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 5, p 1080-1083.
- Vogel T., McCarty P., 1987. Abiotic and biotic transformations of 1,1,1-trichloroethane under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Tech.*, 21(12), p. 1208-1213.
- Yakimov M., Timmis K., Wray V., Fredricson H., 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus Licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, no. 5, pp. 1706-1713.
- Ye D., Siddiqi A., Maccubbin A., Kumar S., Sikka H., 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 30, p. 136-142.

- Zamojski L., Stachowski J., Carter S., 1999. A case history of enhanced bioremediation utilizing pure oxygen injection. *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*. Alleman och Leeson (Eds.). The Fifth Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symp., San Diego April., p. 65-70.
- Zeng Y., Hong A., Wavrek D., 2000. Integrated chemical-biological treatment of benzo(a)pyrene. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 5, pp. 854-862
- Zeng E., Vista C., 1995. Compositional indices of polycyclic aromatic hydrocarbon sources off San Diego, California.  
<http://www.sccwrp.org/pubs/annrpt/94-95/art-04.htm> (2000-12-06; Southern California Coastal Water Research Project Authority (SCCWRP)).
- Zinder S., 2000. Reductive dechlorination – overview. Dept. Microbiol, Cornell Univ. USA.  
<http://www.hgl.com/Serdp/technicl.htm>
- Zymax Forensics, USA; 2000-12-06.  
[http://www.zymaxforensics.com/forensics/forensics\\_primer/5.5\\_middle\\_distillate\\_and\\_heavy\\_fuel\\_oil\\_characterization.htm](http://www.zymaxforensics.com/forensics/forensics_primer/5.5_middle_distillate_and_heavy_fuel_oil_characterization.htm)  
alternativt:  
<http://www.zymaxforensics.com/primer/index.asp>