

**Duurzaamheid van
anaërobe natuurlijke
attenuatie op sites
verontreinigd met BTEX**

**SAMEN MAKEN WE
MORGEN MOOIER**



**Duurzaamheid van
anaërobe natuurlijke
attenuatie op sites
verontreinigd met BTEX**

Documentbeschrijving



1. *Titel publicatie*

Duurzaamheid van anaërobe natuurlijke attenuatie op sites verontreinigd met BTEX

2. *Verantwoordelijke uitgever*

Danny Wille, OVAM, Stationsstraat 110, 2800 Mechelen

3. *Aantal blz.*

85

4. *Wettelijk depot nummer*

D/2010/5024/44

5. *Aantal tabellen en figuren*

35 tabellen; 8 figuren

6. *Publicatiereeks*

Achtergronddocument bodembeheer

7. *Datum publicatie*

April 2010

8. *Trefwoorden*

bodemverontreiniging, natuurlijke attenuatie, biobeschikbaar Fe, BTEX, petroleumkoolwaterstoffen

9. *Samenvatting*

Dit document bevat een literatuuroverzicht van de factoren die bepalend zijn voor de duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van BTEX. De beschikbare kennis omtrent anaërobe biologische afbraak van BTEX onder verschillende redoxomstandigheden wordt samengevat. In veel gevallen is de hoeveelheid biobeschikbaar driewaardig ijzer (Fe(III)), dat als elektronacceptor kan fungeren, bepalend. Er wordt een overzicht gegeven van de gangbare methoden om biobeschikbaar Fe(III) te bepalen. In twee gevalstudies werden de verschillende meetmethoden voor biobeschikbaar Fe(III) experimenteel met elkaar vergeleken.

10. *Begeleidingsgroep en/of auteur*

S. Manshoven, T. De Ceuster, W. Dejonghe, J. Gemoets (VITO, auteurs), K. Gutschoven (Haskoning België, auteur), G. Van Gestel, T. Gregoir (OVAM)

11. *Contactperso(n)en*

Griet Van Gestel, Jiska Verhulst

12. *Andere titels over dit onderwerp*

Gegevens uit dit document mag u overnemen mits duidelijke bronvermelding.

De meeste OVAM-publicaties kunt u raadplegen en/of downloaden op de OVAM-website: <http://www.ovam.be>

Duurzaamheid van anaerobe natuurlijke attenuatie op sites verontreinigd met BTEX

Rapport

S. Manshoven, T. De Ceuster, W. Dejonghe, J. Gemoets – VITO

K. Gutschoven - Haskoning

Studie uitgevoerd in opdracht van OVAM

VITO-contractnr. 011583

VITO-rapportnr. 2008/MPT/R/244

Inhoud

<u>Inhoud</u>	2
<u>Managementsamenvatting</u>	4
<u>MANAGEMENT SUMMARY</u>	5
<u>1 Projectdoelstellingen</u>	6
1.1 <u>Probleemstelling</u>	6
1.2 <u>Hypothese</u>	6
1.3 <u>Doelstellingen van het project</u>	6
1.4 <u>Inhoud van het onderzoek</u>	7
<u>2 Anaerobe biodegradatie van benzeen, toluen, ethylbenzeen en xylenen (BTEX)</u>	8
2.1 <u>Inleiding</u>	8
2.2 <u>Micro-organismen en afbraakmechanismen</u>	8
2.3 <u>Omstandigheden in de bodem die het anaerobe biodegradatiepotentieel van BTEX beïnvloeden</u>	9
2.3.1 <u>Nitraatreducerende condities</u>	10
2.3.2 <u>Ijzer- en mangaanreducerende condities</u>	11
2.3.3 <u>Sulfaatreducerende condities</u>	12
2.3.4 <u>Methanogene condities</u>	12
2.4 <u>Inschatten van het potentieel voor anaerobe biodegradatie van BTEX</u>	12
2.5 <u>Verhogen van de anaerobe biodegradatiecapaciteit door injectie van elektronacceptors</u>	14
<u>3 Biobeschikbaar ijzer (III) en mangaan (IV) als elektron-acceptoren in anaerobe afbraak</u>	15
3.1 <u>Inleiding</u>	15
3.2 <u>Anaerobe staalname van aquifermateriaal</u>	15
3.3 <u>Bepaling van de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III)</u>	16
3.3.1 <u>Mild zure extractie met 0,5 M HCl</u>	17
3.3.2 <u>Extractie met zuur ammonium oxalaat bij pH 3 (Phillips en Lovley, 1987)</u> ... 18	18
3.3.3 <u>Sequentiële extractie met dithioniet, citraat en bicarbonaat</u>	19
3.3.4 <u>Extractie met Ti3+-EDTA (Heron et al., 1994)</u>	19
3.3.5 <u>Biologische reductie met Shewanella (ESTCP, 2002)</u>	20
3.3.6 <u>Anthraquinone-2,6-disulfonaat (AQDS) – oxidatie (Hacherl et al., 2001)</u> 20	20
<u>4 Evaluatie van de Duurzaamheid van natuurlijke attenuatie</u>	22
4.1 <u>Inleiding</u>	22
4.2 <u>Keuze testsites</u>	22
4.3 <u>Afbraaktesten voor anaerobe natuurlijke attenuatie van BTEX</u>	22
4.4 <u>Relatie tussen BTEX-afbraak en Fe(III)-reductie</u>	23
4.5 <u>Bepalingstechnieken voor biobeschikbaar Fe(III)</u>	24
<u>5 Site 1 te Mechelen</u>	25
5.1 <u>Karakterisatie van de site</u>	25
5.2 <u>Afbraaktesten</u>	28
5.2.1 <u>Opzet</u>	28
5.2.2 <u>Meetresultaten</u>	28
5.2.3 <u>Conclusies</u>	34
5.3 <u>Relatie tussen BTEX-afbraak en Fe(III)-reductie</u>	35
5.3.1 <u>Opzet</u>	35
5.3.2 <u>Meetresultaten</u>	35
5.3.3 <u>Conclusies</u>	38
5.3.4 <u>Vergelijking met de reële situatie op de testsite</u>	40

6	<u>Site 2 te Mortsel</u>	41
6.1	<u>Karakterisatie van de site</u>	41
6.2	<u>Afbraaktesten</u>	44
6.2.1	<u>Opzet</u>	44
6.2.2	<u>Meetresultaten</u>	44
6.2.3	<u>Conclusies</u>	50
6.3	<u>Relatie tussen BTEX-afbraak en Fe(III)-reductie</u>	50
6.3.1	<u>Opzet</u>	50
6.3.2	<u>Meetresultaten</u>	51
6.3.3	<u>Conclusies</u>	56
6.3.4	<u>Monitoring van de situatie op de testsite</u>	57
7	<u>Conclusies</u>	58
7.1	<u>Afbraaktesten BTEX</u>	58
7.2	<u>Biobeschikbaar Fe(III) als indicator voor duurzaamheid</u>	58
7.2.1	<u>Methodes voor de bepaling van biobeschikbaar Fe(III)</u>	58
7.2.2	<u>Relatie tussen BTEX-afbraak en biobeschikbaar Fe(III)</u>	59
7.2.3	<u>Algemene conclusie</u>	59
8	<u>Referenties</u>	61
	<u>BIJLAGEN</u>	67
	<u>Bijlage A: Afbraakroutes BTEX</u>	68
	<u>Bijlage B: Protocols voor bepaling biobeschikbaar Fe(III)</u>	75
	<u>Bijlage C: Stabiliteit en reproduceerbaarheid bepalingsmethodes biobeschikbaar Fe(III)</u>	81

Samenvatting

Natuurlijke attenuatie van petroleumkoolwaterstoffen berust voornamelijk op microbiële afbraakprocessen. Deze dienen in voldoende mate door te gaan om een duurzame oplossing te kunnen vormen voor een bodemverontreiniging die men met natuurlijke attenuatie wenst aan te pakken. De duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van BTEX en petroleumkoolwaterstoffen in anaerobe bodems wordt op vele sites in belangrijkste mate bepaald door de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) in de bodem, dat als elektronacceptor kan fungeren tijdens het afbraakproces.

In het voorliggende project wordt een literatuuroverzicht gegeven van de factoren die bepalend zijn voor de natuurlijke afbraak van BTEX. Vooreerst wordt de beschikbare kennis omtrent de anaerobe biologische afbraak van vooral benzeen, maar ook van TEX onder verschillende redoxomstandigheden samengevat. Verder wordt aandacht besteed aan de invloed van nevenverontreinigingen die kunnen voorkomen op locaties die met benzeen zijn verontreinigd, alsook aan strategieën om de natuurlijke afbraak van BTEX te stimuleren.

Verder wordt een overzicht gemaakt van de gangbare methoden om de hoeveelheid biobeschikbaar ijzer(III) in bodemstalen te bepalen. Aan de hand van twee testsites werden er drie methoden voor het bepalen van de voorraad aan biobeschikbaar Fe(III) geëvalueerd. Deze zijn extractie onder mildzure condities met 0,5 N HCl, Ti(III)EDTA-redoxititratie en microcosms met *Shewanella alga* BrY. Vervolgens werd in afbraakexperimenten de afname van biobeschikbaar Fe(III) gerelateerd aan de BTEX-afbraak.

De BTEX-afbraak was in beide gevalstudies vrij goed in overeenstemming met de waargenomen reductie in biobeschikbaar Fe(III). Dit wijst erop dat Fe(III) in beide gevallen optreedt als elektronacceptor voor de anaerobe afbraak van BTEX. Sulfaatreductie trad niet significant op. Mn(IV)-reductie was verwaarloosbaar voor site 1, maar niet volledig uit te sluiten voor site 2. Deze vaststelling bevestigt dat een goede inschatting van de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) kan gebruikt worden als een nuttig instrument voor de beoordeling van de duurzaamheid van de natuurlijke attenuatie van BTEX.

Uit een vergelijking van de verschillende methoden voor de bepaling van biobeschikbaar Fe(III) kan geconcludeerd worden dat de 0,5M HCl extractie, in combinatie met de ferrozinemethode of IC-ICP het best geschikt is. Naast een goede overeenstemming tussen de waargenomen BTEX-afbraak en de met deze methode gemeten afname in gehalten biobeschikbaar Fe(III), heeft deze methode vooral als voordeel dat ze relatief snel en eenvoudig is.

Om een prognose te maken van de duurzaamheid van natuurlijke afbraak van petroleumkoolwaterstoffen dient men de beschikbare voorraad terminale elektronacceptoren in de verontreinigde zone te vergelijken met de totale vuilvracht die verwijderd dient te worden. Bij de inschatting van de vuilvracht dient men rekening te houden met puur product indien dat aanwezig is.

De elektronacceptoren dienen aantoonbaar relevant te zijn voor de aangetroffen verontreiniging. Op bepaalde locaties is het immers mogelijk dat bacteriën ontbreken die benzeen of MTBE kunnen afbreken met bvb nitraat of sulfaat als elektronacceptor. In een aantal gevallen kan het zijn dat de beschikbare voorraad elektronacceptoren die men op eenvoudige wijze in het grondwater kan meten (zuurstof, nitraat en sulfaat) volstaat om voldoende natuurlijke afbraak van de vuilvracht mogelijk te maken. Dan heeft een bepaling van biobeschikbaar ijzer(III) in grondstalen geen toegevoegde waarde.

SUMMARY

Monitored natural attenuation (MNA) of petroleum hydrocarbons is based on microbial degradation processes. These have to proceed to a sufficient extent to ensure that MNA can provide a durable solution for a contaminated site for which it is selected as the remedial method. The sustainability of natural attenuation of BTEX and hydrocarbons in many anoxic soils is determined considerably by the amount of bioavailable Fe(III) in the soil, which can act as an electron acceptor during biodegradation.

This document includes a review of the scientific literature about the factors that are important for natural attenuation (biodegradation) of BTEX, with a focus on anaerobic biodegradation of benzene under various redox conditions. The influence of secondary pollutants which may affect biodegradation of benzene are discussed, as well as strategies to enhance natural attenuation of BTEX.

Furthermore, a review is made of methods that exist to quantify bio-available iron(III) in soil samples. Three methods for the determination of the bioavailable Fe(III) in soil were selected for further evaluation. These are mild acid extraction (0,5 M HCl), Ti(III)EDTA-redox titration and *Shewanella alga* BrY microcosms). For two test sites the reduction of bioavailable Fe(III) was compared with BTEX biodegradation.

In both case studies the biodegradation of BTEX was well correlated with the observed reduction in bioavailable Fe(III). This indicates that Fe(III) acts in both cases as an electron acceptor for the anaerobic degradation of BTEX. Sulfate reduction was not observed. Mn(IV) reduction was negligible for site 1, but could not be fully excluded for site 2. This observation confirms that a good estimation of the amount of bioavailable Fe(III) can be used as a valuable instrument to evaluate the sustainability of natural attenuation of BTEX.

From the comparison of the different methods it can be concluded that 0,5M HCl extraction, in combination with the ferrozine method or IC-ICP would be the method of choice for the determination of bioavailable Fe(III). The reduction in bioavailable Fe(III) that was measured with this method compared well with the observed BTEX degradation and the method is relatively fast and simple.

The evaluation of the durability of natural attenuation for a specific site is based on balancing the available pool of terminal electron acceptors in the contaminated area with the total contaminant mass that has to be eliminated in order to achieve cleanup goals. The estimation of total contaminant mass has to include free product (NAPL) if that would be present. One has to demonstrate that the electron acceptors are relevant for the site. At some locations it is possible that the bacteria that are present cannot utilize some electron acceptors for biodegradation of the contaminant(s) of concern. For example, benzene or MTBE may not be degraded under nitrate or sulphate reducing conditions.

At a number of locations the available pool of terminal electron acceptors that one can easily measure in groundwater, such as oxygen, nitrate and sulfate, may be sufficient to sustain the required biodegradation of contaminant mass. In those instances it would not be beneficial to also measure bio-available iron(III) in aquifer solid samples.

1 Projectdoelstellingen

1.1 Probleemstelling

Natuurlijke afbraak (MNA) is een bodemsaneringstechniek die steeds vaker wordt overwogen en geaccepteerd als alternatief voor meer ingrijpende saneringsmaatregelen, voornamelijk in geval van locaties verontreinigd met petroleumkoolwaterstoffen. Tot op heden is de evaluatie van de haalbaarheid ervan vooral beperkt tot het aantonen van aanwijzingen voor natuurlijke attenuatie. Het actueel optreden van natuurlijke attenuatie betekent echter nog niet dat de natuurlijke afbraakprocessen voldoende lang zullen aanhouden om een volledige beheersing of verregaande afbraak van de verontreiniging mogelijk te maken over een lange periode. Er is nog geen goed inzicht in de factoren die de duurzaamheid van natuurlijke afbraak bepalen. In Nederland werd er een gelijkaardige studie gewijd aan de duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van verontreinigingen met chloorkoolwaterstoffen (SKB-project). Daarin werd vooral nagegaan welke factoren de beschikbaarheid bepalen van elektondonoren die bacteriën kunnen gebruiken voor reductieve dechlorering.

Voor sites met petroleumkoolwaterstoffen blijkt vaak dat de afbraak van benzeen ontoereikend is, vooral in de verzadigde zone onder zuurstofloze omstandigheden. De factoren die de afbraak van benzeen onder anaerobe omstandigheden bepalen zijn onvoldoende gekend om in een aantal gevallen een uitspraak te kunnen doen over de haalbaarheid van natuurlijke attenuatie.

1.2 Hypothese

De duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van BTEX wordt vooral bepaald door de hoeveelheid elektronacceptoren (EA, natuurlijke oxidantia) die beschikbaar zijn gedurende het proces. Zuurstof is slechts in beperkte mate oplosbaar in water en zal in vele gevallen in onvoldoende mate aanwezig zijn om het attenuatieproces volledig of voldoende snel te laten verlopen. Andere EA die het proces kunnen ondersteunen zijn nitraat, ijzer(III), mangaan(IV), sulfaat en kooldioxide. De belangrijkste voorraad EA in de bodem bestaat waarschijnlijk uit ijzer(III). IJzer(III) en mangaan(IV) zijn slechts gedeeltelijk biobeschikbaar omdat ze weinig wateroplosbare mineralen vormen. De biobeschikbare fractie van ijzer(III) wordt verondersteld in vele gevallen bepalend te zijn voor de duurzaamheid van MNA van petroleum koolwaterstoffen.

In deze studie is vooral aandacht besteed aan methoden waarmee de voorraad aan biobeschikbaar Fe(III) kan worden begroot om de duurzaamheid van MNA beter te kunnen voorspellen. Daarnaast is er een grondige karakterisering uitgevoerd van de andere parameters die bepalend zijn voor de processen van natuurlijke attenuatie. Hierbij wordt ook aandacht besteed aan factoren die de afbraak van benzeen kunnen verklaren.

1.3 Doelstellingen van het project

- Vergroten van de kennis omtrent natuurlijke attenuatie van benzeen en BTEX in het algemeen, vooral met betrekking tot de rol van elektronacceptoren en aanwezige organische stoffen;

- Opdoen van praktijkervaring met evaluatie van natuurlijke attenuatie. Het is ondertussen voldoende bewezen dat natuurlijke afbraak mogelijk is van TEX en soms ook van benzeen, maar er is onvoldoende praktijkervaring met het voorspellen van de duurzaamheid in de tijd, met de monitoring ervan en met de factoren die het al dan niet optreden van afbraak van benzeen bepalen;
- Het opleveren van een geverifieerde methode om de voorraad biobeschikbaar ijzer(III) in de bodem te begroten en aan de hand hiervan een betere inschatting te kunnen maken van de duurzaamheid van natuurlijke attenuatie.

1.4 Inhoud van het onderzoek

In hoofdstuk 2 wordt een literatuuroverzicht gegeven van de factoren die bepalend zijn voor de natuurlijke afbraak van BTEX. Vooreerst wordt de beschikbare kennis omtrent de anaerobe biologische afbraak van vooral benzeen, maar ook van TEX onder verschillende redoxomstandigheden samengevat. De aerobe afbraak is reeds eerder beschreven in het protocol van OVAM voor aerobe bioremediatie van petroleum koolwaterstoffen (OVAM, 2005). Verder wordt aandacht besteed aan de invloed van nevenverontreinigingen die kunnen voorkomen op locaties die met benzeen zijn verontreinigd, alsook aan strategieën om de natuurlijke afbraak van BTEX te stimuleren.

In hoofdstuk 3 wordt een overzicht gegeven van de gangbare methoden om de hoeveelheid biobeschikbaar ijzer(III) in bodemstalen te bepalen. Enkele van deze methoden worden toegepast en vergeleken in 2 praktijksituaties om de duurzaamheid van de natuurlijke afbraak te evalueren.

Het potentieel en de duurzaamheid van anaerobe afbraak van BTEX zal in afbraaktesten onder laboratoriumomstandigheden worden nagegaan voor de 2 proeflocaties. Hierbij zijn Vlaamse sites gebruikt waarvoor reeds een BBO werd uitgevoerd en die in aanmerking komen voor sanering door MNA. De bevindingen van deze proeven worden weergegeven in hoofdstukken 4, 5 en 6.

Op basis van het onderzoek wordt in hoofdstuk 7 een evaluatie gemaakt van de waarde van de gevolgde werkwijze.

2 Anaerobe biodegradatie van benzeen, toluen, ethylbenzeen en xylenen (BTEX)

2.1 Inleiding

Op BTEX-verontreinigde sites dragen zowel aerobe als anaerobe biodegradatie bij tot natuurlijke pollutieverwijdering. Aanvankelijk verdwijnt de zuurstof; vervolgens de elektronacceptoren voor anaerobe afbraak. Deze intrinsieke biodegradatieprocessen geven doorgaans aanleiding tot z.g. redoxzonering (methanogeen – sulfaatreducerend - Fe(III)/Mn(IV)-reducerend – denitrificerend - aerob) in de grondwaterpluim benedenstrooms van de verontreinigingsbron (o.a.: Tiehm and Schulze, 2003). Deze redoxzonering kan worden 'in beeld gebracht' door chemische en geochemische analyses, meting van de redoxpotentiaal en bepaling van waterstofgasconcentraties. De biodegradatie kan ook rechtstreeks worden aangetoond via verandering van verhoudingen tussen verontreinigingen, fractionatie van stabiele isotopen van bvb koolstof en waterstof, aanwezigheid van specifieke metabolische producten en via afbraaktesten in het laboratorium met representatieve veldstalen (microcosms). Deze microcosmstudies kunnen zeer nuttig zijn om de degradatiemechanismen te bestuderen en de rol van specifieke elektronacceptoren en redoxomstandigheden te begrijpen. Ze laten ook toe om na te gaan of de toediening van extra elektronacceptoren of nutriënten stimulerend kan werken, waarbij de labotest dan ook dient als basis voor het ontwerp (dimensionering) van een piloot of full-scale bioremediatie door injectie van dergelijke 'hulpstoffen'.

2.2 Micro-organismen en afbraakmechanismen

Volgens de biodegradatie-databank 'The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (<http://umbbd.ahc.umn.edu/>)' is er tot dusver nog geen enkel uniek organisme geïsoleerd dat benzeen volledig kan mineraliseren onder anaerobe condities. Er zijn wel aanrijningsculturen bekend die bacterieconsortia bevatten die dit kunnen. De exacte afbraakroutes zijn volgens dezelfde bron zeer complex en nog niet volledig gekend. Coates et al. (2001) publiceerden wel een studie waarin ze zuivere bacteriestammen (geen aanrijningsculturen) beschrijven die benzeen zouden kunnen afbreken met nitraat als elektronacceptor. Toluene en ethylbenzeen zijn volgens deze bron wel volledig anaeroob afbreekbaar; zij hebben een *gemeenschappelijk biodegradatie-intermediair*, n.l. *benzoaat* dat wordt geactiveerd tot *benzoyl-CoA*. Deze verbinding lijkt het centrale intermediair te zijn in anaerobe BTEX mineralisatie. De aromatische ring van benzoyl-CoA wordt gereduceerd en uiteindelijk omgevormd tot *acetyl-CoA*, een centrale bouwsteen van alle leven. Volgens de database zijn eerder een beperkt aantal organismen in staat om xylene te metaboliseren onder anaerobe omstandigheden. Een aantal onder hen betreft denitrificerende bacteriën die *m*-xylene kunnen gebruiken als groeistruktuur. Ook deze afbraakroutes zijn nog niet volledig bekend. In appendix A worden de volledige afbraakroutes getoond zoals die beschikbaar zijn in *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database*.

Coates et al. (2002) bevestigen dat het anaeroob afbraakmechanisme voor benzeen nog niet duidelijk is. Wel worden in geval van afbraak fenol en benzoaat op consistente wijze teruggevonden als intermediairen. De hydroxylatie van benzeen tot fenol lijkt daarmee een van de eerste stappen te zijn in de degradatiereacties, gevolgd door carboxylatie van de fenol tot 4-hydroxybenzoaat en reductieve verwijdering van de hydroxylgroep (met vorming van benzoaat). Langenhoff en van Ras (2006) vonden eveneens aanwijzingen voor het vormen

van intermediaire fenolen, maar de opvolging van deze intermediairen in afbraakexperimenten stelt problemen, gezien hun grote reactiviteit. Enkel bij uitputting van sulfaat, in methanogene condities, bleken fenolen stabiel. Er zouden echter ook andere reactiewegen bestaan afhankelijk van het type anaeroob micro-organisme. Dit wordt nog steeds intensief verder onderzocht. Martus and Püttmann (2003) rapporteerden b.v. de aanwezigheid van een aantal nog niet eerder beschreven gealkyleerde aromatische zuren in anaeroob grondwater afkomstig van een kerosine-verontreinigde locatie. De redoxcondities waren hier sulfaatreducerend.

Bekende toluenaafbrekende bacteriën zijn de nitraat-reducerende genera *Azoarcus* en *Thauera*, en de *Geobacteraceae* onder ijzerreducerende omstandigheden. Daarnaast zijn sulfaatreducerders (*Desulfobacteriaceae*) in staat toluen anaeroob te metaboliseren (Harwood and Gibson, 1997). Volgens de meeste studies uitgevoerd tot 1997 *breekt benzeen niet af onder anaerobe omstandigheden*. De studies die wél afbraak vaststelden, concludeerden dat de afbraak gebeurde onder nitraat-, Fe(III)- en Mn(IV)-reducerende condities, slechts in enkele artikels wordt beweerd dat afbraak ook gebeurt onder methanogene omstandigheden. Reinhard et al. (1997) beschrijven BTEX-verwijdering uit grondwater in aanwezigheid van nitraat en sulfaat en stellen dat benzeen en o-xyleen recalcitrant zijn. Onder nitraatreducerende omstandigheden werden E, T en m-X verwijderd binnen 6 dagen; in aanwezigheid van sulfaat verdwenen T en X na 60 dagen. Holliger and Zehnder (1996) en Lovley (1997; 2000) stellen wel al dat BTEX-afbraak (ook benzeen) waargenomen is onder alle 'normale' anaerobe omstandigheden: nitraatreducerend, ijzer(III)-reducerend, sulfidogeen en methanogeen.

2.3 Omstandigheden in de bodem die het anaerobe biodegradatiepotentieel van BTEX beïnvloeden

In een aantal recente reviewartikels (o.a. Lin et al, 2002; Johnson et al., 2003) wordt een overzicht gegeven van de beschikbare kennis rond anaerobe biodegradatie van BTEX. Van alle oliecomponenten wordt benzeen als meest problematisch beschouwd bij grondwaterverontreiniging wegens zijn toxiciteit, relatief hoge wateroplosbaarheid en merkwaardig stabiele structuur. Slechts recent is er enige literatuur beschikbaar waaruit blijkt dat benzeen inderdaad anaeroob kan worden afgebroken maar dat de betreffende organismen niet alomtegenwoordig zijn. Bepaalde studies geven tegenstrijdige conclusies zoals Nales et al. (1998) die benzeenaafbraak vaststelden onder NO_3^- , SO_4^{2-} en Fe(III)-reducerende condities maar niet onder methanogene condities, terwijl Kazumi et al. (1997) beweren dat benzeen slechts kan worden afgebroken onder methanogene, SO_4^{2-} and Fe(III)-reducerende omstandigheden. Eén van de mogelijke verklaringen voor tegenstrijdige experimentele resultaten wordt gegeven door Phelps and Young (1999) die met hun studie illustreerden dat BTEX-afbraak onder denitrificerende, sulfidogene, methanogene en ijzerreducerende omstandigheden vlot verliep in sedimenten die reeds een *lange BTEX-blootstellingsvoorgeschiedenis* hadden. Alle BTEX werden afgebroken binnen 21-91 dagen. Anaerobe BTEX-afbraak trad echter niet of nauwelijks op in sedimenten die nog nooit aan BTEX waren blootgesteld.

Anaerobe afbraak van TEX is veel algemener dan benzeenafbraak. TEX of andere gemakkelijker assimileerbare koolstofbronnen zouden anaerobe afbraak van benzeen kunnen verhinderen (Nales et al., 1998; Ruiz-Aguilar et al, 2002). Een recente studie hieromtrent werd gepubliceerd door Meckenstock et al. (2004). Zij stelden vast dat in sulfaatreducerende sedimentkolommen die doorspoeld werden met een mengsel van BTEX, de tolueenafbraak startte na een lag-periode van enkele weken. Zodra een mengsel van BEX (geen tolueen) werd gedoseerd, werd o-xyleen afgebroken. Zodra dan opnieuw ook tolueen werd gedoseerd, viel de xyleenafbraak terug stil. Als dan wederom de tolueenadditie werd gestaakt, kwam de xyleenafbraak opnieuw op gang.

Borden et al. (1995) voerden een veldstudie uit naar de natuurlijke afbraak van BTEX in een met benzine verontreinigde aquifer en stelden vast dat tolueen en o-xyleen het snelst afbraken, gevolgd door m-, p-xyleen en ten slotte benzeen. Ethylbenzeen leek hier echter trager af te breken dan benzeen onder de anaerobe condities in het centrum van de pluim. De snelheid en volledigheid van de afbraak leken te worden beheerst door het *type en hoeveelheid van de beschikbare elektronacceptors in de aquifer*. Tiehm and Schulze (2003) onderzochten intrinsieke biodegradatie in een met teerolie verontreinigde aquifer. In microcosms gebeurde de biodegradatie van tolueen en ethylbenzeen onder sulfaatreducerende condities terwijl tolueen, ethylbenzeen en benzeen afbraken in aanwezigheid van Fe(III).

Bij hoge BTEX- (of andere koolstofbron) concentraties kan de afbraak van TEX zoveel elektronacceptoren verbruiken dat er onvoldoende overblijft voor de tragere benzeenafbraak (Ruiz-Aguilar et al, 2002; Da Silva and Alvarez, 2002). Het gebruik van aanrijkingsculturen in labotesten kan snelgroeiende micro-organismen bevoordelen ten koste van trager groeiende organismen die in staat zijn benzeen af te breken over lange incubatie- of verblijftijden (Rabus et al., 1999).

Vanbeelen and Vanvlaarding (1994) bestudeerden *toxische effecten* van verschillende types polluenten op de afbraak van benzoaat in microcosms met methanogeen sediment. Het effect van de toevoeging van benzeen, chloroform, 1,2-dichloroethaan, pentachlorofenol en zink op de mineralisatiereacties werd onderzocht. De benzoaatafbraak werd met 10% geremd bij respectievelijke addities van 150; 0,04; 71; 6 en 842 mg/kg d.s. sediment. Chloroform blijkt dus zeer toxisch voor de anaerobe bacteriën die benzoaat afbreken. Amor et al. (2001) toonden met biodegradatie-experimenten aan dat nikkel meestal het minst toxische metaal is voor biodegradatie van alkylbenzenen. Zink bleek daarentegen meest toxisch. Inhibitie-effecten werden door deze auteurs kwantitatief uitgedrukt (gemodelleerd). Bradley et al. (1992) tonen in een studie nog de invloed aan van de pH op BTEX-afbraak onder denitrificerende omstandigheden: bij pH 4 was de denitrificatiesnelheid 38 % lager dan bij pH 7.

2.3.1 Nitraatreducerende condities

Lang werd gedacht dat benzeen recalcitrant was onder nitraatreducerende omstandigheden. Het gebeurt alleszins veel trager dan aerobe afbraak en bepaalde studies stellen dat nog enige O₂ noodzakelijk is (micro-aerofilie) om de oxygenases te activeren die de oxidatieve aromatische-ringbreuk tot stand brengen, zelfs als de eigenlijke terminale elektronacceptor niet zuurstof zelf is (o.a. Yerushalmi et al., 2002). Alvarez and Vogel (1995) testten vier verschillende BTEX-gecontamineerde aquiferstalen in microcosms onder nitraatreducerende

condities. Toluëen werd vlot afgebroken, evenals o-xyleen. M- en p-xyleen werden slechts afgebroken in één van de 4 microcosms. Benzeen was schijnbaar recalcitrant. Bij aanwezigheid van geringe hoeveelheden zuurstof observeerden zij echter wél benzeenafbraak. Anidet et al. (1993) gebruikten een doorstroomkolom met BTEX-gecontamineerd aquifermateriaal die gevoed werd met een nitraatoplossing met zuurstofgehalten onder <1 mg/l. Toluëen werd binnen de experimentele termijnen (enkele maanden) effectief afgebroken ($>90\%$) en meer dan 25% van de benzeen, 40% van de ethylbenzeen, 50% van de m- en p-xylenen en 60% van de o-xyleen. Sommige recentere studies beweren echter dat nitraatreducerende bacteriën benzeen niet kunnen afbreken (Kao and Borden, 1997). Nales et al. (1998) toonden daarentegen aan dat benzeen wél afbrak onder nitraatreducerende condities, maar dat TEX de afbraak inhibeerde (competitief substraat). Volgens Burland en Edwards (1999) gebeurt de afbraak van benzeen tijdens reductie van nitraat naar nitriet, maar niet tijdens verdere reductie tot gasvormige stikstof. Recenter toonden Coates et al. (2001) aan dat zuivere bacteriestammen bestaan (geen aanrijkingsculturen) die benzeen kunnen afbreken met nitraat als elektronacceptor. Eén van deze stammen werd geïsoleerd op haar capaciteit om (per)chloraat te kunnen reduceren (*Dechloromonas* strain RCB); de andere op het vermogen om humus te oxideren (*Dechloromonas* strain JJ). Beide leden van het genus *Dechloromonas* zijn klaarblijkelijk alomtegenwoordig in bodems, dus zou benzeenafbraak onder nitraatreducerende omstandigheden volgens deze auteurs eerder regel zijn dan (locatiespecifieke) uitzondering. Globaal beschouwd besluiten we dat afbraak van benzeen onder nitraatreducerende condities zeker niet vanzelfsprekend is.

2.3.2 IJzer- en mangaanreducerende condities

Sommige bodems die zijn ontstaan uit mariene afzettingen bevatten veel ijzer, zoals de Diestiaanafzettingen. Volgens Heider et al. (1999) kan benzeen worden afgebroken onder ijzerreducerende omstandigheden maar zijn er tot dusver geen individuele afbrekende bacteriën geïsoleerd. Het genus *Geobacter* wordt verondersteld een rol te spelen. Daarnaast bestaan er primitieve benzeenafbrekers (*hyperthermofielen*), waarvan bekend is dat ze Fe(III) gebruiken als elektronacceptor (Anderson et al., 1998, weinig relevant voor bodemsanering). Caldwell en Sufliata (2000) toonden benzeenafbraak aan in een aanrijkingscultuur afkomstig van een olieverontreinigde site, wanneer deze werd geïncubeerd met Fe(III) als elektronacceptor. Villatoro-Monzon et al. (2003) onderzochten anaerobe BTEX-biodegradatie in batch experimenten met een anaeroob sediment als inoculum onder Fe(III) en Mn(IV) reducerende condities. Alle BTEX werden afgebroken, vooral onder Mn(IV) reducerende condities. Benzeen werd verwijderd aan $0,8 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$, beduidend sneller dan onder Fe(III) reducerende omstandigheden: daar verdween ethylbenzeen het snelst ($0,19 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$). Deze auteurs stellen dat Mn(IV) reducerende condities energetisch gunstiger zijn dan Fe(III) reductie, waardoor BTEX sneller zouden worden afgebroken onder Mn(IV) reducerende omstandigheden. Amorfe mangaan(IV)oxiden zijn volgens dezelfde auteurs goede potentiële elektronacceptors voor anaerobe BTEX-afbraak.

2.3.3 Sulfaatreducerende condities

Reinhard et al. (1997) onderzochten BTEX-afbraak onder verschillende anaerobe redoxcondities en stelden slechts benzeenafbraak vast onder sulfaatreducerende condities. Volledige mineralisatie van benzeen tot CO₂ onder sulfaatreducerende condities werd in microcosms aangetoond en ook in gecontamineerde aquifers (Anderson en Lovley, 2000). Aangezien de aanrijking van aquifers met bekende sulfaatreducerende benzeenafbrekers resulteerde in de afbraak van benzeen en groei van benzeenafbrekende organismen, concludeerden Weiner en Lovley (1998) dat een gebrek aan benzeenafbrekers in sommige aquifers de oorzaak kan zijn van recalcitrantie van benzeen, eerder dan een gebrek aan geschikte milieucondities. Morasch et al. (2001) slaagden erin anaerobe sulfaatreducerende bacteriën uit verontreinigde aquiferstalen aan te rijken met o-xyleen en m-xyleen als enige koolstof- en energiebron. Twee nieuwe xyleen-degraderende culturen werden zo verkregen die toluen *niet* konden gebruiken als enige koolstofbron. Klaarblijkelijk kon één cultuur o- én m-xyleen afbreken maar niet p-xyleen; terwijl een andere sulfaatreducerende cultuur m-xyleen kon oxideren tot CO₂ maar niet o- of p-xyleen. Franzmann et al. (2002) concludeerden uit geochemische gegevens van een grondwaterverontreinigingspluim met oliecomponenten dat sulfaatreductie zich snel instelde als het uiteindelijke elektronacceptorproces. Onder deze omstandigheden gebeurde wel afbraak van toluen, maar niet van benzeen. Noch toevoeging van grote hoeveelheden van de betrokken sulfaatreducerders, noch van extra sulfaat leidde tot een verhoogde toluenafbraak; ook bleef benzeenafbraak achterwege. In een recent SKB-project werd de anaerobe afbraak van benzeen gestimuleerd door het toevoegen van sulfaat, waarbij de afbraak werd opgevolgd via een combinatie van afbraaktesten, het meten van intermediären, stabiele isotopenanalyse en moleculaire technieken (Langenhoff en van Ras, 2006).

2.3.4 Methanogene condities

Indien CO₂ als enige potentiële elektronacceptor aanwezig is, zou benzeen kunnen afbreken tot CO₂ en methaan (Grbic-Galic en Vogel, 1987; Kazumi et al., 1997). Een volledige mineralisatie zou echter niet mogelijk zijn. Elshahed et al. (2001) zagen in microcosms met sediment van een aquifer die was verontreinigd met een gascondensaat dat toluen, ethylbenzeen en xylenen anaeroob werden afgebroken met verbruik of productie van stoichiometrische hoeveelheden sulfaat of methaan.

2.4 Inschatten van het potentieel voor anaerobe biodegradatie van BTEX

Een combinatie van laboratoriumexperimenten en veldmetingen m.b.t. de hydrogeologie en hydrogeochemie zijn nodig om het potentieel voor natuurlijke attenuatie op een bepaalde locatie, en de duurzaamheid van de processen, goed te kunnen inschatten. Een aantal nieuwe technieken, zoals de bepaling van *stabiele isotopen* (o.a. Richnow et al., 2003; Griebler et al., 2004; Langenhoff en van Ras, 2006), kunnen hiertoe bijdragen. Een andere mogelijkheid is de *injectie van gedeutereerde surrogaatverbindingen* (bvb. toluen-d(8) en o-xyleen-d(10)) gevolgd door een push-pull test om de in-situ vorming van gedeutereerde

anaerobe afbraakproducten vast te stellen (benzylsuccinaat en o-methylbenzylsuccinaat) (Reusser et al., 2002).

Wiedemeier et al. (1996) stellen twee methoden voor om site-specieke biodegradatiesnelheden voor BTEX in grondwater af te leiden. Beide gebruiken pollutieconcentraties gemeten in peilbuizen en de hydrologische eigenschappen van de aquifer om een biodegradatie-snelheidsconstante af te leiden die kan worden gebruikt in stoftransportmodellen. In de eerste methode wordt een biologisch recalcitrante tracer gebruikt die mede voorkomt in de BTEX-pluim; daarmee worden de veranderingen in BTEX-gehalten onder anaerobe omstandigheden genormaliseerd. De afname van de tracer in tijd en ruimte wordt toegeschreven aan verdunning, sorptie en/of vervluchtiging. De mate waarin de BTEX-concentraties méér afnemen dan de tracer wordt dan toegeschreven aan biodegradatie. De tweede methode kan worden toegepast indien kan worden verondersteld dat de pluim in dynamisch evenwicht verkeert. Een eendimensionele analytische oplossing van de advectie-dispersievergelijking staat dan toe de attenuatiesnelheid te bepalen die noodzakelijk is opdat de pluim zich in een dergelijke evenwichtstoestand kan bevinden. Beide methoden werden toegepast op gegevens van een kerosine-verontreinigde site in de USA. In de grondwaterstromingsrichting werden natuurlijke attenuatiesnelheden afgeleid voor BTEX die varieerden van 0,006 tot 0,038 dag⁻¹, met een gemiddelde van 0,02 dag⁻¹. De attenuatiesnelheid voor benzeen varieerde van 0,025 tot 0,038 dag⁻¹. Beide methoden gaven een gelijkaardig resultaat. Biodegradatie was het dominante attenuatieproces.

Namocatcat et al. (2003) stellen dat trimethylbenzozuren als belangrijke *metaboliemerkers* kunnen worden beschouwd in kerosine-verontreinigde aquifers. Veranderingen in de samenstelling van deze organische zuren en de temporele en ruimtelijke verdelings- en concentratieprofielen van 2,4,6- en 2,3,5-trimethylbenzozuur weerspiegelen de afbraakprocessen in een evoluerende verontreinigingspluim. Deze alkylbenzenen kunnen dus gebruikt worden als stabiele tracers voor de afbraak van andere koolwaterstoffen. Ook specifieke analyses op gekende (eventueel minder stabiele) reactieproducten kunnen worden gebruikt als biomerkers voor monitoring van BTEX-afbraak in anaerobe systemen (Beller HR, 2000; Chakraborty and Coates, 2004). De publicatie van Baun et al. (2003) is een voorbeeld van een goede aanpak om anaerobe biodegradatie van verontreinigingen in het veld (pluim van stortplaatspercolaat in grondwater) te bestuderen. In het sterk anaerobe deel van de pluim werden 49 grondwaterstalen gekarakteriseerd naar redoxparameters, pollutanten, degradatie-intermediären en toxiciteit. Een recente meetronde werd vergeleken met een vroegere meetronde (10 jaar geleden). Door combinatie van alle gegevens kon worden besloten dat de pluim stationair was gebleven over de 10-jarige periode en dat de meeste pollutanten in de pluim onderhevig waren aan biodegradatie. *Benzeen en een herbicide (MCP) bleken hier als enige individuele pollutieparameters recalcitrant.*

Beller et al. (2002) ontwikkelden een *real-time PCR methode (Polymerase Chain Reaction)* die BTEX-afbrekende bacteriën kan kwantificeren in sedimentstalen. Deze is gebaseerd op een gen dat een rol speelt in de eerste stap van anaerobe toluen- en xyleenafbraak (een onderdeel van het enzym benzylsuccinaatsynthase). De methode werd getest op 4 denitrificerende bacteriële stammen en bleek ook een goed instrument voor de monitoring van natuurlijke anaerobe attenuatie van BTEX in verontreinigd grondwater.

Van Ras et al. (2007) ontwikkelden een 3-staps protocol om de duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van BTEX na te gaan. Dit protocol postuleert dat anaerobe natuurlijke attenuatie duurzaam kan zijn indien voldoende nitraat, biobeschikbaar Mn(IV) en Fe(III) en/of sulfaat aanwezig zijn in de verontreinigde zone of als de grondwaterconcentraties aan nitraat en/of sulfaat stroomopwaarts of de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) en Mn(IV) in de bodem stroomafwaarts voldoende is om de biologische degradatie te bevoorraden.

Men kan de afbraak van specifieke verontreinigingen ook aantonen door het meten van de incorporatie van stabiele isotopen (bv. koolstof-13) in microbiel celmateriaal. Daarvoor gebruikt men speciaal daartoe met C-13 verrijkte stoffen die na een incubatieperiode worden gemeten in de lipidenfractie van biomassa die men isoleert uit de milieustalen die ermee zijn in contact gebracht.

2.5 Verhogen van de anaerobe biodegradatiecapaciteit door injectie van elektronacceptors

Schmitt et al. (1996) toonden in een veldsituatie met zeer hoge BTEX-concentraties aan dat anaerobe natuurlijke afbraak gerelateerd was aan nitraat- maar vooral sulfaatreductie. Er kan in dergelijke gevallen stagnatie van afbraak optreden door uitputting van deze elektronacceptors. Reinhard et al. (1997) injecteerden BTEX-houdend grondwater met bromide als tracer (470-1700 L) in een BTEX-gecontamineerde aquifer via een meervoudig injectie/extractiefilter en onttrokken dit vervolgens weer over een periode van 2 à 3 maanden. Om het effect van nitraat- en sulfaatreducerende omstandigheden te bestuderen, werd tevens nitraat of sulfaat geïnjecteerd. In de nitraatconditie werden toluen, ethylbenzeen en m-xyleen direct (binnen 10 dagen) afgebroken, o-xyleen pas na 72 dagen. In de sulfaatconditie werden toluen, m-xyleen en o-xyleen volledig verwijderd in minder dan 50 dagen, ethylbenzeen na 60 dagen. Benzeen werd schijnbaar verwijderd onder de sulfaatreducerende omstandigheden, maar de afbraak was niet volledig.

Schreiber en Bahr (2002) injecteerden nitraat in een petroleum-verontreinigde aquifer en zagen vervolgens toluen, ethylbenzeen en de xylenen verdwijnen na een lag-periode van ca. 9 dagen. Benzeen verdween echter niet binnen de 60-dagen durende monitoringperiode. Ze stelde ook vast dat nitraat in veel hogere mate verdween dan stoichiometrisch verwacht voor TEX oxidatie. Dit werd toegeschreven aan nitraatverliezen voor de oxidatie van organische verbindingen ander dan TEX. Een gelijkaardige studie werd verricht door Cunningham et al. (2000, 2001). Zij demonstreerden de mogelijkheid om de anaerobe biodegradatie van BTEX te induceren door gelijktijdige injectie van nitraat én sulfaat. Nitraat werd het eerste verbruikt, in een zone van 4 à 6 m rondom de injectieplaats. Daarna trad vervolgens sulfaatreductie op. De totale elektronacceptorcapaciteit werd effectief verhoogd. Dit lukte met een mengsel van nitraat en sulfaat beter dan wanneer nitraat of sulfaat afzonderlijk zouden zijn geïnjecteerd. Door meerdere types elektronacceptors te gebruiken werd tevens een betere afbraak van alle BTEX verkregen. Benzeenafbraak werd echter pas significant na een lange periode (15 maanden).

3 Biobeschikbaar ijzer (III) en mangaan (IV) als elektron-acceptoren in anaerobe afbraak

3.1 Inleiding

Eén van de mogelijke anaerobe afbraakroutes van BTEX verloopt onder ijzer- en mangaanreducerende condities (Villatoro-Monzon et al., 2003; Heider et al., 1999). IJzer komt van nature voor in de ondergrond en is in belangrijke hoeveelheden aanwezig in bodems ontstaan uit mariene afzettingen. Fe(III) komt voor in amorfe structuren, zoals ferrihydriet ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), akageniet ($\beta\text{-FeOOH}$), lepidocrociet ($\gamma\text{-FeOOH}$), maghemiet en in kristallijne structuren, zoals goetiet ($\alpha\text{-FeOOH}$), hematiet ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en magnetiet (Fe_3O_4). Meestal is de oxidatiecapaciteit van een bodem bij benadering gelijk aan de som van het aanwezige biobeschikbare Fe(III) en Mn(IV). De hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) en Mn(IV) in de aquifer (verzadigde bodem) speelt bijgevolg een belangrijke rol in de keuze van natuurlijke attenuatie als saneringsconcept voor een met BTEX verontreinigde site.

De biobeschikbare fractie van een elektron-acceptor wordt typisch gelijkgesteld met de wateroplosbare fractie. Voor ijzer(III)oxides is het echter moeilijk om de biobeschikbaarheid in te schatten, gezien de complexe interacties tussen de verschillende ijzerspeciës onderling en tussen bacteriën en oxide-oppervlakken (Hacherl et al., 2001).

De bepaling van het totaal ijzer- en mangaangehalte in waterige oplossingen is reeds lange tijd uitgegroeid tot een routineanalyse (AAS, AES, ICP). Het meten van deze gehalten in de bodemfase stelt tot op heden nog tal van problemen, aangezien standaardmethoden ontbreken. Over het algemeen worden de in het grondwater gemeten concentraties aan Fe^{2+} en Mn^{2+} beschouwd als een maat voor de hoeveelheid gereduceerde Fe(III) en Mn(IV). Men gaat er hierbij van uit dat de in de bodem aanwezige Fe(III) en Mn(IV) beschikbaar blijft, zolang de Fe^{2+} - en Mn^{2+} -concentraties in het grondwater stijgen. In vele gevallen is de gemeten concentratie aan $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ echter een onderschatting, daar een gedeelte van het gevormde $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ neerslaat op minerale oppervlakken of uitgewisseld wordt met kationen uit kleimineralen. Bovendien geven de in het grondwater aanwezige Fe^{2+} - en Mn^{2+} -concentraties geen informatie over de nog aanwezige voorraden aan Fe(III) en Mn(IV) in de bodemfase. Men gaat er van uit dat typisch ongeveer 10-30% van de totaal aanwezige hoeveelheid ijzer in een aquifer biobeschikbaar kan zijn.

3.2 Anaerobe staalname van aquifermateriaal

Een betrouwbare bepaling van de Fe(III)- en Mn(IV)gehalten in een aquiferstaal vereist een anaerobe staalnametechniek. Contact met luchtzuurstof tijdens de staalname zal immers de oxidatie van $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ tot Fe(III)/Mn(IV) tot gevolg hebben, waardoor de gemeten concentraties geen correcte afspiegeling zijn van de aanwezigheid *in situ*. Anaerobe staalname is echter verre van eenvoudig en meestal is speciale apparatuur vereist. Er bestaan meerdere staalname instrumenten die toelaten om anaerobe bodemmonsters te nemen, waaronder de split-spoon sampler en de Shelby tube de meest bekende zijn. Afhankelijk van de bodemgesteldheid, de gewenste boordiepte en de aanwezigheid van watervoerende lagen in het boortraject dienen andere staalname technieken aangewend te worden (Starr en Ingleton, 1992). Men kan ook gewone metalen steekhulzen of *Geoprobe* liners gebruiken die volledig gevuld in het veld worden afgesloten van de omgevingslucht.

De verwerking, behandeling en bewaring van de anaerobe grondmonsters gebeurt in een zuurstofarme atmosfeer, zoals anaerobe kasten en met inert gas gespoelde, afgesloten recipiënten of gaszakken.

3.3 Bepaling van de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III)

De bepaling van het gehalte aan Fe(III) in aquiferstalen gebeurt in de meeste methodes in twee stappen. In een eerste stap wordt het aanwezige Fe(III) geëxtraheerd uit de minerale fase, waarna het Fe(III)-gehalte in het extract wordt bepaald. In de literatuur worden tal van extractievloeistoffen voorgesteld voor de ontsluiting van Fe(II)/Fe(III) uit een minerale fase. Voor de bepaling van Fe(III) wordt veelal gewerkt met HCl (met uiteenlopende concentraties zoals 0,5M, 5M, 6M met verwarming, 12N). Verder gebruikt men ook hydroxylamine hydrochloride (HA-HCl) als extractiemiddel, maar ook enkelvoudige extracties met Ti^{3+} /EDTA en ammoniumoxalaat (pH 3) en sequentiële extracties met dithioniet-citraat-bicarbonaat worden eveneens vermeld (Heron *et al.*, 1994; Hacherl *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 1998). Door gebruik te maken van gecombineerde extracties – $CaCl_2$, HCl, en Ti(III)-EDTA samen met de sequentiële extractie HI-Cr(II) en kokende HCl-extracties – kan men een goed beeld bekomen van de verschillende vormen van ijzer en mangaan die aanwezig zijn in de bodem.

Voor de bepaling van 'biobeschikbaar' Fe(III) wordt er over het algemeen gewerkt met 'zachte' extractiemethodes, die een indicatie geven van de hoeveelheid amorf en zwak kristallijn Fe(III), zoals 0,5M HCl (24u) en ammoniumoxalaat. Hierbij dient men er echter over te waken dat de extractievloeistof de beschikbare hoeveelheid niet overschat door het bevorderen van de oplosingprocessen van kristallijne ijzermineralen, wat het geval is voor oxalaatextractie (Hacherl *et al.*, 2001, Heron *et al.*, 1994). Op basis van een uitgebreide vergelijking van verschillende bepalingsmethodes concluderen Heron *et al.* (1994) dat een extractie met 0,5M HCl het meest geschikt is om een snelle indicatie te verkrijgen van de redoxtoestand van de bodem, aangezien deze een schatting geeft van het gehalte amorfe Fe(III)hydroxides en gereduceerde Fe(II)-verbindingen, zoals FeS en $FeCO_3$. Extractie met Ti(III)-EDTA geeft een goed beeld van de Fe(III)oxides die bijdragen aan de oxidatiecapaciteit van een bodem, terwijl een 6M HCl extractie het totale gehalte aan Fe(II) en Fe(III) weergeeft.

Naast chemische extractietechnieken werd eveneens een methode ontwikkeld op basis van microbiële reductie van ijzer(III) door *Shewanella* BrY (Hacherl *et al.*, 2001; ESTCP, 2002).

Na extractie kunnen de Fe^{2+} - en Fe^{3+} -concentratie in het extract bepaald worden met verschillende analytische technieken waaronder IC-ICP-MS (IonenChromatografie - Inductief gekoppeld plasma / MassaSpectrometrie), IC-ICP-AES (IonenChromatografie - Inductief gekoppeld plasma / Atoom Emissie Spectroscopie), IC-UV-Vis (IonenChromatografie - Ultraviolet en zichtbaar licht).

Zonder voorafgaandelijke scheiding meten de vermelde detectoren (ICP-MS, ICP-AES, UV-Vis) het totaal Fe-gehalte. Ook met AAS (atomaire absorptie spectroscopie) en spectrofotometrie kan de totaal Fe-concentratie in het extract gemeten worden. M.b.v. de totaal concentratie kan de Fe^{3+} -concentratie indirect bepaald worden door het verschil te maken van de totale concentratie Fe en het

Fe²⁺-gehalte. Fotospectrometrie is een techniek waarmee Fe²⁺-concentraties kunnen gemeten worden (zie bijlage C in dit rapport).

In de volgende paragrafen worden enkele methoden voor de bepaling van biobeschikbaar Fe(III) meer in detail toegelicht.

3.3.1 Mild zure extractie met 0,5 M HCl

Met 0,5 N HCl extraheert men in 24 tot 48 uur de meest reactieve amorfe en zwak kristallijne ijzerverbindingen in een sedimentstaal. Een mild zure extractie zet de Fe(III)mineralen vrij die vatbaar zijn voor microbiële reductie (Kennedy *et al.*, 1998).

3.3.1.1 Extractie met hydroxylamine-HCl (HA-HCl)

Kristallijne ijzer(III)oxiden (zoals magnetiet, Fe₃O₄) zijn slechts weinig reduceerbaar door ijzerreducerende bacteriën, waardoor meestal enkel de niet-kristallijne fractie van de ijzer(III)oxiden als 'biobeschikbaar' wordt beschouwd. Volgens deze redenering kan de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) bepaald worden door extractie met 0,25 M hydroxylamine hydrochloride, waarbij amorf Fe(III) tot wateroplosbaar Fe²⁺ gereduceerd wordt, terwijl minder dan 1% van de kristallijne ijzer(III)oxiden op deze wijze gereduceerd worden (Hacherl *et al.*, 2001).

Chao and Zhou (1983) publiceerden een methode die amorfe ijzeroxiden in bodem en sediment selectief extraheert. Men extraheert het bodemstaal in één stap met een gemengde oplossing van 0,25 M hydroxylamine hydrochloride (HA-HCl) in 0,25 M HCl bij 50°C. Tijdens de extractie wordt een bepaalde fractie Fe(III) gereduceerd, waarvan wordt aangenomen dat ze nauw aansluit bij de biobeschikbare fractie. Na de extractie wordt het extract gefilterd en het Fe²⁺-gehalte in het filtraat bepaald.

Sommige sterk gereduceerde bodems kunnen echter grote hoeveelheden Fe(II)-verbindingen bevatten die zuuroplosbaar zijn. Voor deze bodems zal de methode van Chao en Zhou de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) sterk overschatten. Om dit probleem te ondervangen, ontwikkelden Lovley en Phillips (1987) een variant op deze methode die wel rekening houdt met de initieel aanwezige, zuur extraheerbare Fe(II)-fractie.

De methode van Lovley en Phillips (1987) bestaat uit 2 parallelle extracties, waarbij één bodemstaal geëxtraheerd wordt met 0,5 M HCl als extractievloeistof en een tweede bodemstaal met 0,25 M HA-HCl in 0,25 M HCl. In beide extracties wordt onder anaerobe omstandigheden een gekende hoeveelheid bodem of sediment toegevoegd aan de extractievloeistof en na incubatie bij kamertemperatuur wordt het extract toegevoegd aan ferrozineoplossing en gefiltreerd. Tijdens de HCl-extractie wordt het extraheerbaar Fe(II) bepaald, aangezien deze extractie geen oxidatie van Fe(II) of reductie van Fe(III) veroorzaakt. In de extractie met HA-HCl in HCl, wordt naast de extractie van reeds aanwezig Fe(II) ook Fe(III) gereduceerd tot Fe²⁺. De hoeveelheid Fe²⁺ in beide filtraten wordt spectrofotometrisch gemeten. Uit de resultaten van beide extracties wordt vervolgens de hoeveelheid hydroxylamine-reduceerbaar Fe(III) berekend als het verschil tussen de Fe²⁺-gehalten in beide filtraten.

Een minpunt is dat de ferrozinemethode niet specifiek is voor Fe^{2+} . Op de geselecteerde golflengte ($\lambda=562$ nm) wordt $\text{Fe}_{\text{totaal}}$ (de som van Fe^{2+} en Fe^{3+}) gemeten. Het deel Fe(III) dat reeds na 1 uur geëxtraheerd is wordt bijgevolg ook meegemeten. Daarentegen wordt akageniet ($\beta\text{-FeOOH}$) dat deels ($\pm 12\%$) biobeschikbaar is, niet geëxtraheerd door deze methode.

3.3.1.2 **Mildzure extractie volgens het IMBEMA-protocol (Kennedy et al., 1989)**

In het IMBEMA-protocol wordt het sediment gedurende 48 uur geëxtraheerd met 0,5 N HCl onder anaerobe condities. Het extract wordt gefilterd en de ijzerconcentratie in het filtraat wordt spectrofotometrisch gemeten.

Bij de fotospectrometrische bepaling wordt Fe^{3+} op een indirecte manier bepaald, als het verschil van het $\text{Fe}_{\text{totaal}}$ - en Fe^{2+} -gehalte. De Fe^{2+} -bepaling is gebaseerd op HACH-methode 8146. Door toevoeging van HACH-reagens (1,10-phenanthroline) aan het filtraat en buffering met NaHCO_3 wordt een gekleurd Fe^{2+} -complex gevormd, waarvan de concentratie op $\lambda=510$ nm wordt gemeten. Het gehalte aan $\text{Fe}_{\text{totaal}}$ in het filtraat wordt bepaald via HACH-methode 8147. Derivatisering gebeurt met ferrozine en het gevormde complex wordt gemeten op $\lambda=562$ nm. Gekende interferenties bij de ferrozine methode zijn deze met koper, kobalt en sterke chelaten (HACH Company, 1992).

Na 48h zijn FeS en Fe(OH)_3 volledig geëxtraheerd. Voor biologisch gevormd sideriet (FeCO_3) en magnetiet (Fe_3O_4) situeert het extractierendement zich tussen 73 en 100% (Kennedy *et al.*, 1998). Kristallijne Fe(III)-soorten (goetiet (Fe(OOH)) ($\pm 5\%$ na 24h), hematiet (Fe_2O_3) (1-2,5% na 24h) en magnetiet (Fe_3O_4) (1-2,5% na 24h)) worden in zeer beperkte mate geëxtraheerd. Er is 50% vrijzetting (na 24 h) voor abiotisch gevormd FeCO_3 (Heron *et al.*, 1994). FeS_2 wordt niet geëxtraheerd.

3.3.1.3 **Extractie met 0,5 M HCl, gevolgd door ionenchromatografie (Schnell et al., 1998)**

In de methode volgens Schnell *et al.* (1998) wordt de grond anaeroob geëxtraheerd met 0,5 M HCl op kamertemperatuur gedurende 24 uur. De metaalionen in het extract worden gescheiden met ionchromatografie met een HPLC waarbij men als eluens tartraatbuffer gebruikt.

3.3.2 **Extractie met zuur ammonium oxalaat bij pH 3 (Phillips en Lovley, 1987)**

De extractie met zuur ammonium oxalaat wordt courant gebruikt in de bepaling van amorfe en zwak kristallijne ijzeroxiden. Phillips en Lovley (1987) wijzigden de klassieke aerobe extractiemethode, zodat deze onder anaerobe omstandigheden kan worden gebruikt voor de bepaling van de oxalaat-extraheerbare Fe(II)- en Fe(III)-fracties. Nat sediment (drogen of vriesdrogen veroorzaakt oxidatie van Fe^{2+}) wordt onder anaerobe omstandigheden gemengd met een ammoniumoxalaat-oxaalzuuroplossing. Het Fe(II)-gehalte van het extract wordt bepaald via de ferrozinemethode. Het totaal ijzergehalte wordt vervolgens bepaald door gefilterd extract in ferrozine anaeroob te incuberen met hydroxylamine-hydrochloride oplossing om Fe(III) te reduceren. Vervolgens wordt opnieuw het Fe(II)-gehalte gemeten, wat overeenkomt met het totaal gehalte door oxalaat geëxtraheerd Fe. Fe(III) wordt vervolgens berekend als het verschil tussen het totaal ijzergehalte en Fe(II).

3.3.3 Sequentiële extractie met dithioniet, citraat en bicarbonaat

In deze methode wordt de bodem voorbehandeld met natriumcitraat en bicarbonaat en verhit. Daarna wordt het chemisch reduceermiddel dithioniet toegevoegd om ijzer(III) om te zetten in ijzer(II) dat wordt geanalyseerd (Heron *et al.*, 1994).

3.3.4 Extractie met Ti³⁺-EDTA (Heron *et al.*, 1994)

De totale oxidatiecapaciteit (OXC) van een bodem is gedefinieerd als het aantal elektronen (mol) dat de bodem per volume-eenheid kan opnemen. De OXC komt overeen met de beschikbaarheid van elektronacceptoren en wordt berekend met onderstaande formule:

$$\text{OXC} = 4 \times \text{C}(\text{O}_2) + 5 \times \text{C}(\text{NO}_3^-) + \text{C}(\text{Fe}(\text{III})) + 2 \times \text{C}(\text{Mn}(\text{IV})) + 8 \times \text{C}(\text{SO}_4^{2-}) + 4 \times \text{C}(\text{TOC})$$

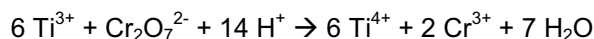
met C : concentratie in bodem (mol/m³);

OXC : oxidatiecapaciteit (mol e⁻/m³ bodem)

TOC : totaalgehalte organische koolstof (mol/m³).

In de meeste gevallen is de oxidatiecapaciteit van een bodem bij benadering gelijk aan de concentratie Fe(III).

Het Ti³⁺-EDTA-complex reduceert ijzeroxiden in de bodem, maar ook O₂, NO₃⁻, mangaanoxiden, SO₄²⁻ en organisch materiaal, waarbij het zelf geoxideerd wordt naar Ti⁴⁺-EDTA. De oxidatiecapaciteit van een bodemstaal wordt bepaald als het verschil van de initieel toegevoegde hoeveelheid Ti³⁺ en de met redoxtitratie bepaalde restconcentratie Ti³⁺. De titratie van Ti³⁺ gebeurt met dichromaat, waarbij neutraalrood als redoxindicator wordt gebruikt.



Voor de bepaling van de oxidatiecapaciteit van het aquiferstaal wordt onder anaerobe omstandigheden Ti³⁺-EDTA-oplossing toegevoegd. Na 24 h incubatie wordt het mengsel gefilterd en wordt het filtraat in anaerobe condities getitreerd met K₂Cr₂O₇.

Dit is de enige methode in deze literatuurstudie waar de 'totale' oxidatiecapaciteit van de aquifer bepaald wordt. De vrij hoge extractierendementen voor een aantal kristallijne Fe(III)-structuren - goetiet (93%), hematiet (93%) en in mindere mate ook magnetiet (8-10%) – geven echter aan dat een deel van de op deze wijze bepaalde oxidatiecapaciteit niet biobeschikbaar is.

3.3.5 Biologische reductie met *Shewanella* (ESTCP, 2002)

De ijzerreducerende bacterie (FeRB) *Shewanella alga* BrY reduceert biobeschikbaar Fe(III) tot Fe²⁺. Op basis van dit principe ontwikkelde en patenteerde de firma *New Horizons Diagnostics* de 'bioavailable ferric iron assay'. In deze test wordt de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) bepaald als het verschil tussen het Fe²⁺-gehalte na 1 maand incubatie en het Fe²⁺-gehalte in het originele grondstaal.

Men incubeert de grond anaeroob in een flesje dat naast gevriesdroogde *Shewanella alga* BrY ook natriumlactaat als elektronendonator, sporelementen, vitamines, minerale zouten en reagentia bevat die de Fe(III)-reductie versnellen o.a. AQDS (1,5-AnthraQuinon natrium DiSulfonaat). Tijdens deze incubatie verbruikt *Shewanella* lactaat en reduceert daarbij het biobeschikbaar Fe(III) in het grondstaal. Na 1 maand incubatie wordt HCl aan de microcosm toegevoegd om Fe²⁺ op te lossen. Het meegeleverde HCl is zodanig geconcentreerd dat na toevoeging in het flesje een 0,5 M HCl oplossing wordt verkregen (cf. extractiemethodes beschreven in 3.3.1). Het Fe²⁺-gehalte in het extract wordt met de ferrozine methode spectrofotometrisch bepaald.

Deze testkit heeft als voordeel dat het een gestandaardiseerde microcosmtest betreft, die is geoptimaliseerd opdat een maximaal gehalte aan biobeschikbaar ijzer kan bepaald worden. De methode kan echter een overschatting geven van de sitespecifieke beschikbaarheid van ijzer(III) omdat de resultaten gebaseerd zijn op de activiteit van *Shewanella alga* BrY en niet op de sitespecifieke ijzerreducerende bacteriën. Bovendien worden in de test "elektronvectoren" (AQDS) gebruikt om de reductie van Fe(III) te versnellen. Dit kan een overschatting betekenen van de biobeschikbaarheid van Fe(III) aangezien niet in alle bodems natuurlijke chelerende agentia of elektronvectoren aanwezig zijn. Nog een nadeel is de vrij lange incubatietijd van 1 maand alvorens de resultaten beschikbaar zijn. Ook het gebruik van een standaard hoeveelheid HCL kan leiden tot uiteenlopende extractierendementen in functie van de zuurbuftercapaciteit van de bodem.

3.3.6 Anthraquinone-2,6-disulfonaat (AQDS) – oxidatie (Hacherl et al., 2001)

IJzer(III)-verbindingen in de microporiën van de bodem zijn moeilijk te klasseren als wel of niet biobeschikbaar. Bacteriën kunnen deze microporiën niet binnendringen. Het bepalen van de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) via een chemische extractie kan bijgevolg een overschatting geven, aangezien chemische middelen toch in deze microporiën kunnen diffunderen. Anderzijds bevatten bodems vaak opgelost organisch materiaal dat in staat is Fe(III) te complexeren of als elektronenvector op te treden. Een mogelijke techniek om de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) te bepalen, zou gebruik kunnen maken van reacties die vergelijkbaar zijn met de microbiële elektronenoverdracht. Dit principe kan worden toegepast via een indirecte coulometrische titratie (ICT) met AHDS, de gereduceerde quinolvorm van AQDS. ICT wordt frequent gebruikt voor het bestuderen van elektro-actieve biologische systemen waarin biocomponenten irreversibel elektrochemisch of redox gedrag vertonen.

In deze methode wordt een kleine hoeveelheid bodem in een anaeroob en gebufferd medium gebracht, samen met een gekende hoeveelheid AHDS. De oxidatie van AHDS to AQDS - en de daaraan gekoppelde reductie van Fe(III) tot Fe²⁺ - wordt opgevolgd door de absorptie bij 405 nm te meten met indirecte coulometrische titratie. Nadat al het initieel toegevoegde AHDS is weggereageerd, wordt AHDS toegevoegd tot geen afname meer wordt waargenomen van de absorptie. De geproduceerde hoeveelheid Fe²⁺ (of de origineel aanwezige hoeveelheid Fe(III)) wordt omgerekend tot de geoxideerde hoeveelheid AHDS. Het resultaat van de titratie is de som van "biologisch beschikbaar" Fe(III); een som die bestaat uit extern aanwezig Fe(III) (en bijgevolg direct toegankelijk voor ijzerreducerende bacteria) en uit Fe(III) aanwezig in microporiën dat biobeschikbaar is indien elektronenvectoren of stoffen die Fe(III)-complexen kunnen vormen aanwezig zijn.

Een voordeel van deze methode is dat biobeschikbaar Fe(III) onmiddellijk kan bepaald worden, zonder dat er voorafgaandelijk een extractie dient uitgevoerd te worden. Indien in de bodem echter geen natuurlijke 'electronshuttles' of complexanten aanwezig zijn, geeft de AHDS-methode een sterke overschatting.

4 Evaluatie van de Duurzaamheid van natuurlijke attenuatie

4.1 Inleiding

Natuurlijke attenuatie van BTEX kan slechts optreden indien de redoxcondities gunstig zijn voor microbiële afbraak. Deze natuurlijke afbraak is duurzaam indien er voldoende biobeschikbare elektronacceptoren aanwezig zijn in de verontreinigde zone.

In dit project wordt getracht een betrouwbare, gebruiksvriendelijke meetmethode te selecteren die gebruikt kan worden voor het inschatten van de duurzaamheid van een saneringsconcept op basis van natuurlijke attenuatie. Meer specifiek wordt gekeken naar de anaerobe bioremediatie van BTEX met Fe(III) als elektronacceptor.

4.2 Keuze testsites

Voor twee specifieke locaties wordt de haalbaarheid van natuurlijke attenuatie als saneringsconcept nagegaan. Het betreft 2 sites waarvoor reeds een beschrijvend bodemonderzoek werd uitgevoerd. In het kader van de sanering werd in beide gevallen de kernzone van de verontreiniging reeds ontgraven en komt de restverontreiniging in aanmerking voor sanering door natuurlijke attenuatie onder ijzerreducerende condities. Bij de keuze werd rekening gehouden met de karakteristieken van de aquifer, die voldoende Fe(III) dient te bevatten.

De eerste site is een tankstation in Mechelen, waarop een verontreiniging met benzine is vastgesteld. De resultaten van deze tests zijn beschreven in hoofdstuk 5.

De tweede site betreft een voormalig tankstation in Mortsel, waarop een verontreiniging met benzine is vastgesteld. Het tankstation is inmiddels volledig verwijderd. De resultaten van deze tests zijn beschreven in hoofdstuk 6.

Van beide sites werden grondwaterstalen gekarakteriseerd voorafgaandelijk aan de afbraaktests.

4.3 Afbraaktesten voor anaerobe natuurlijke attenuatie van BTEX

Door middel van afbraaktesten in microcosms met het bodemmateriaal van beide testsites wordt nagegaan of sites verontreinigd met petroleumkoolwaterstoffen (voornamelijk BTEX) via natuurlijke attenuatie gesaneerd kunnen worden.

Hierbij worden de volgende aspecten nagegaan:

- of er een potentieel is voor anaerobe afbraak van de aanwezige polluenten, nl. BTEX en andere petroleumkoolwaterstoffen (o.a. MTBE en alkanen);
- of de waargenomen afbraak kan gerelateerd worden aan de afname van de hoeveelheden biobeschikbare elektronacceptoren (in hoofdzaak Fe(III)) en/of eventuele andere parameters in het aquifermateriaal van de microcosm.

Voor beide testsites werden in de microcosmtesten twee condities onderzocht:

- een abiotische controle met toevoeging van een inhibitor voor microbiële activiteit;
- een levende testconditie (natuurlijke attenuatie).

De microcosmtesten worden in een anaerobe kast onder N₂-atmosfeer opgestart, waarbij voor elke testconditie 5 identieke microcosms worden bereid. Voor elke microcosm wordt respectievelijk 30 g ds aquifer en 70 ml grondwater in een serumflesje gebracht. Indien nodig wordt het grondwater vooraf aangerijkt met BTEX (dit was het geval voor site 2). De microcosmflesjes worden met teflongecoate rubber septa afgesloten om de anaerobe condities te kunnen handhaven. Ze worden bij kamertemperatuur bewaard.

Per testconditie worden 3 microcosms op regelmatige tijdstippen bemonsterd voor de opvolging van de BTEX-afbraak. BTEX-gehalten en in het geval van site 1 ook andere VOC (isopropylbenzeen, propylbenzeen, 1,3,5- en 1,2,4- trimethylbenzeen) worden via headspace-GC/FID/FID gemeten in de laboratoria van VITO, groep MPT. Hierbij wordt doorheen een septum telkens een zeer klein volume van de headspace bemonsterd, zonder de microcosm te openen. MTBE werd in geval van site 1 wegens interferentie met de aanwezige oliecomponenten gemeten via GC/MS (mits opoffering van een microcosm aan het begin en het einde van de test), terwijl bij site 2 MTBE eveneens via headspace-GC/FID/FID kon worden gemeten.

Op 3 tijdstippen doorheen de test (begin, halverwege en aan het einde van de test) worden chemische analyses (elektronacceptoren, metalen en DOC) op het supernatans van de microcosms uitgevoerd via de opoffering van de overige microcosm replica's.

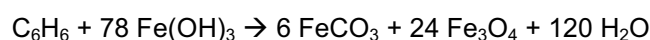
Gedurende alle handelingen wordt zorg gedragen voor het bewaren van strikt anaerobe condities.

4.4 Relatie tussen BTEX-afbraak en Fe(III)-reductie

Na BTEX-afbraak wordt het gehalte aan biobeschikbaar Fe(III) in elke microcosmos gemeten en vergeleken met het oorspronkelijk gehalte voor incubatie. Het verbruikte gehalte aan Fe(III) wordt vervolgens gerelateerd aan de waargenomen BTEX-afbraak.

Als basis voor de berekening van de elektronenuitwisseling tussen BTEX en Fe(III) tijdens de natuurlijke afbraak, werd uitgegaan van volgende reactievergelijkingen voor de oxidatie van BTEX (Pijls *et al*, 2006):

Benzeen:



Tolueen:



Ethylbenzeen en xyleen:



4.5 Bepalingstechnieken voor biobeschikbaar Fe(III)

Uit de literatuurstudie blijkt dat er meerdere technieken bestaan die een inschatting kunnen geven van de hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III). De zachte extractie met 0,5 M HCl en de microcosmtest met ijzerreducerende *Shewanella alga* BrY leken beloftevol in het kader van dit onderzoek. Daarnaast wordt de Ti^{3+} -EDTA-extractie aanzien als een goede methode om de totale oxidatiecapaciteit van een bodem te bepalen. Voor elke testsite wordt het biobeschikbaar Fe(III) in een reeks bodemstalen geëvalueerd volgens deze 3 methodes. De resultaten worden met elkaar vergeleken en eveneens gerelateerd aan het theoretisch Fe(III)-verbruik tijdens de anaerobe BTEX-afbraak.

Doelstelling is om een betrouwbare, gebruiksvriendelijke meetmethode te selecteren die gebruikt kan worden voor het inschatten van het potentieel en de duurzaamheid van de anaerobe bioremediatie van BTEX met Fe(III) als elektronacceptor.

5 Site 1 te Mechelen

5.1 Karakterisatie van de site

Site 1 te Mechelen betreft een site met een grond- en grondwaterverontreiniging met minerale olie, BTEX en MTBE, afkomstig van ondergrondse brandstoftanks. In de kernzone is puur product aanwezig. Een gedeelte van de kernzone werd ontgraven.

De staalname van grondwater en aquifermateriaal werd door VITO uitgevoerd op 22/1/2004 en 2/3/2004.

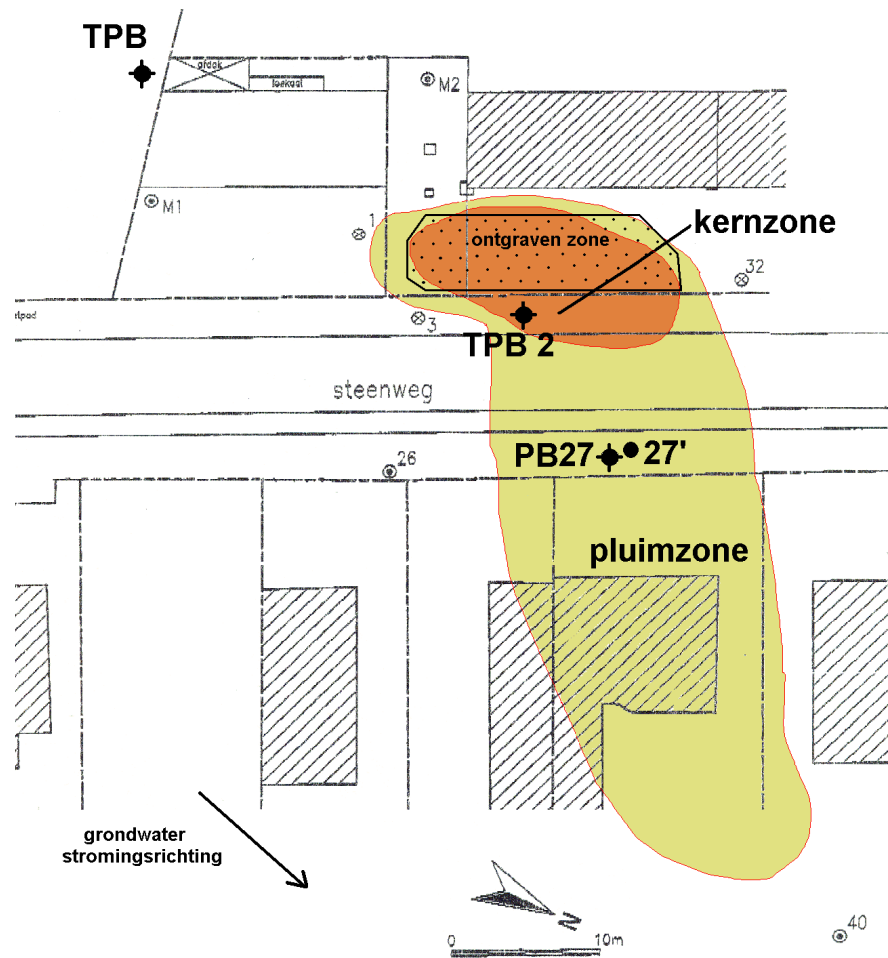
De aquiferstalen werden op drie verschillende locaties genomen:

- ter hoogte van tijdelijke peilbuis TPB (stroomopwaarts van de verontreiniging);
- ter hoogte van tijdelijke peilbuis TPB 2 (in de verontreinigingskern);
- boring 27', ter hoogte van bestaande peilbuis PB27 (stroomafwaarts van TPB2, halverwege de pluim).

PB27 behoort waarschijnlijk tot de fundering van het wegdek. Indien dit het geval is, dan is de kans groot dat de lithologische oorsprong van deze grond verschillend is van de grond rondom TPB.

Grondwaterstalen zijn afkomstig uit peilbuizen TPB, TPB 2 en PB27.

Alle staalnames gebeurden op anaerobe wijze. De grondstalen werden genomen als ongeroerde monsters met liners door middel van een Geoprobetoestel, waarbij de stalen onmiddellijk onder stikstof zijn verpakt en naar VITO zijn getransporteerd. Het grondwater is bemonsterd onder stikstofatmosfeer.



Figuur 1: Situatieschets site 1 te Mechelen

De grond- en waterstalen werden voorafgaandelijk aan de afbraaktesten gekarakteriseerd. De resultaten worden weergegeven in Tabel 5.1.

Tabel 5.1: Karakterisatie van de site 1 te Mechelen

Grondwater – veldparameters							
Peilbuis	Filter-stelling (m-mv)	Datum staalname	T (°C)	pH	Conductiviteit (µS/cm)	ORP (mV)	DO (mg/l)
TPB	3,5-4,5	22/01/2004	9,8	6,5	999	185	0,65
PB27	4,0-5,0	22/01/2004	12,5	6,0	740	5	0,42
TPB 2	3,5-4,5	2/03/2004	10,2	6,7	1200	-35	0,85
PB27	4,0-5,0	2/03/2004	11,7	6,75	905	63	0,45
Grondwater – elektronacceptoren, DOC en verontreinigingen							
				TBP	27'	TPB 2	
				22/01/2004	22/01/2004	2/03/2004	
	DIC	mg C/l		31	69	84	
	DOC	mg C/l		11	162	25	
Metalen	Fe	µg/l		758	19 100	25 600	
	Mn	µg/l		158	14 900	9 310	
Stikstof	Nitraat	mg N/l		5,87	<dl	<dl	
Zwavel	sulfaat	mg/l		405	76,2	334	
Minerale	<C6-12	µg/l		<dl	1 400	29 000	
Olie	<C6	%		-	74	3	
Vluchtig	C6-8	%		-	9	10	
	C8-10	%		-	3	61	
	>C10	%		-	15	26	
VOC	benzeen	µg/l		<dl	16	1 100	
	MTBE	µg/l		<dl	2 400	680	
	naftaleen	µg/l		<dl	10	<dl	
	Tolueen	µg/l		<dl	<dl	1 200	
	ethylbenzeen	µg/l		<dl	<dl	1 800	
	m- +p-xyleen	µg/l		<dl	<dl	5 500	
	o-xyleen	µg/l		<dl	<dl	4 100	
	styreen	µg/l		<dl	<dl	230	
	isopropylbenzeen	µg/l		<dl	<dl	97	
	propylbenzeen	µg/l		<dl	<dl	210	
	1,3,5-trimethylbenzeen	µg/l		<dl	<dl	660	
	1,2,4-trimethylbenzeen	µg/l		<dl	<dl	2 300	
	p-isopropyl-tolueen	µg/l		<dl	<dl	6	
	n-hexaan*	µg/l		<dl	<dl	90	
	n-heptaan*	µg/l		<dl	<dl	40	
n-octaan*	µg/l		<dl	<dl	6		

ORP: oxido-reductiepotentiaal in mV

DO: opgeloste zuurstof (dissolved oxygen)

DOC: opgeloste organische koolstof (dissolved organic carbon)

DIC: opgeloste anorganische koolstof (dissolved inorganic carbon)

<dl: waarde kleiner dan de detectielimiet

5.2 Afbraaktesten

5.2.1 Opzet

Er werden twee microcosmtesten opgestart, de eerste met aquifer materiaal van boring 27' (3,0 - 3,5 m-mv, halverwege de pluimzone), vlak naast PB27, en de tweede met aquifer materiaal van boring TPB 2 (3,0 – 3,5 m, kernzone). Alle gebruikte aquifer materiaal van TPB 2 (3,0-3,5 m) was afkomstig uit een gehomogeniseerd mengmonster.

Voor beide testen werd grondwater van peilbuis TPB 2 gebruikt.

In beide microcosmtesten werden twee testcondities onderzocht. Elke testcondities werd in 5-voud uitgevoerd, waarbij 3 replica's (flesjes 1-2-3) gebruikt werden voor de opvolging van de VOC-concentraties tijdens de incubatie, terwijl 2 replica's (flesjes 4 en 5) respectievelijk na 0 en 14 weken werden opgeofferd voor de bepaling van pH, ORP en elektronacceptoren. Aan het einde van de incubatie (na 41 weken) werden eveneens flesjes 1 tot 3 opgeofferd voor bepaling van pH, ORP en elektronacceptoren.

Onderzochte testcondities:

- een abiotische controle met toevoeging van een inhibitor voor microbiële activiteit;
- een levende testconditie (natuurlijke attenuatie).

5.2.2 Meetresultaten

In paragraaf 4.3 wordt de testopzet in detail toegelicht. Wijzigingen of aanvullingen t.o.v. deze testopzet worden in volgende paragrafen telkens vermeld.

Op regelmatige tijdstippen (na 10, 13, 20, 26, 35 en 39 weken incubatie) werd de afbraak van VOC gemeten. De resultaten zijn voorgesteld in de volgende tabellen.

Verklaring van onderstaande tabellen:

- **<dl**: kleiner dan detectielimiet
- **nb**: niet bepaald
- voor de berekening van de gemiddelden en de standaarddeviatie werden waarden <dl gelijk gesteld aan nul.

Tabel 5.2: Overzicht concentraties BENZEEN (µg/l) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	891	818	855	803	807	754	824
TPB2 abiotisch 2	897	832	852	809	798	913	899
TPB2 abiotisch 3	900	811	853	921	894	934	880
gemiddelde TPB2 abiotisch standaarddeviatie	896 4	820 9	853 2	845 54	833 44	867 80	868 32
TPB2 biotisch 1	1020	674	631	511	228	228	54
TPB2 biotisch 2	1030	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	1053	494	192	182	67	<dl	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch standaarddeviatie	1034 14	389 285	274 264	231 212	99 96	76 107	18 25
27' abiotisch 1	832	755	777	786	904	732	841
27' abiotisch 2	842	753	791	764	919	755	872
27' abiotisch 3	832	728	806	791	951	839	792
gemiddelde 27' abiotisch standaarddeviatie	835 4	745 12	791 12	780 12	925 20	775 46	835 33
27' biotisch 1	850	503	548	472	410	82	183
27' biotisch 2	919	<dl	<dl	<dl	<dl	5	<dl
27' biotisch 3	809	553	563	303	165	<dl	<dl
gemiddelde 27' biotisch standaarddeviatie	860 45	352 250	370 262	258 195	192 168	29 38	61 92

Tabel 5.3: Overzicht concentraties TOLUEEN (µg/l) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	860	757	757	731	662	535	470
TPB2 abiotisch 2	896	702	752	722	640	709	580
TPB2 abiotisch 3	884	719	776	729	727	696	561
gemiddelde TPB2 abiotisch standaarddeviatie	880 15	726 23	762 10	727 4	676 37	647 79	537 48
TPB2 biotisch 1	887	82	72	88	19	56	<dl
TPB2 biotisch 2	906	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	964	48	16	47	12	9	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch standaarddeviatie	919 33	43 34	29 31	45 36	10 8	22 24	<dl nb
27' abiotisch 1	776	707	689	687	777	582	558
27' abiotisch 2	797	660	681	681	784	547	550
27' abiotisch 3	768	676	707	682	804	627	533
gemiddelde 27' abiotisch standaarddeviatie	780 12	681 20	692 11	684 3	788 12	586 33	547 10
27' biotisch 1	815	37	25	19	28	16	19
27' biotisch 2	871	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	759	28	15	19	28	8	<dl
gemiddelde 27' biotisch standaarddeviatie	815 46	22 16	14 10	13 9	19 13	8 7	6 9

Tabel 5.4: Overzicht concentraties ETHYLBENZEEN (µg/l) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	841	787	650	680	669	397	331
TPB2 abiotisch 2	841	635	660	605	609	559	431
TPB2 abiotisch 3	892	655	709	581	698	526	397
gemiddelde TPB2 abiotisch	858	692	673	622	659	494	386
standaarddeviatie	24	67	26	42	37	70	42
TPB2 biotisch 1	422	30	<dl	<dl	14	10	4
TPB2 biotisch 2	443	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	550	19	16	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch	472	16	5	<dl	5	3	<dl
standaarddeviatie	56	12	8	nb	7	5	2
27' abiotisch 1	803	765	672	770	713	553	512
27' abiotisch 2	835	693	629	723	696	473	436
27' abiotisch 3	845	657	675	774	713	561	434
gemiddelde 27' abiotisch	827	705	659	756	707	529	461
standaarddeviatie	18	45	21	23	8	40	36
27' biotisch 1	770	<dl	7	18	44	11	13
27' biotisch 2	847	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	713	8	6	9	<dl	<dl	<dl
gemiddelde 27' biotisch	777	3	4	9	15	4	4
standaarddeviatie	55	4	3	7	21	5	6

Tabel 5.5: Overzicht som van de concentraties aan meta- en para-XYLEEN (µg/l) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	3546	2571	2408	2156	2100	1196	952
TPB2 abiotisch 2	3515	2280	2518	2121	1920	1598	1248
TPB2 abiotisch 3	3349	2370	2752	2241	2190	1536	1113
gemiddelde TPB2 abiotisch	3470	2407	2559	2173	2070	1443	1104
standaarddeviatie	86	121	144	51	112	177	121
TPB2 biotisch 1	3617	16	<dl	43	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 2	3493	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	3771	<dl	<dl	6	<dl	<dl	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch	3627	5	<dl	16	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	113	8	nb	19	nb	nb	nb
27' abiotisch 1	3108	2855	2548	2332	2099	1707	1508
27' abiotisch 2	3295	2548	2360	2223	2050	1456	1251
27' abiotisch 3	3163	2580	2615	2350	2138	1740	1278
gemiddelde 27' abiotisch	3189	2661	2508	2302	2096	1634	1346
standaarddeviatie	78	138	108	56	36	127	115
27' biotisch 1	3328	896	12	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 2	3500	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	3024	879	6	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde 27' biotisch	3284	592	6	<dl	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	197	418	5	nb	nb	nb	nb

Tabel 5.6: Overzicht concentraties o-XYLEEN (µg/l) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	3028	2295	2087	2001	1892	1289	1153
TPB2 abiotisch 2	2857	1949	2152	1874	1782	1649	1444
TPB2 abiotisch 3	2686	2026	2373	1977	2050	1605	1328
gemiddelde TPB2 abiotisch	2857	2090	2204	1950	1908	1514	1308
standaarddeviatie	140	148	122	55	110	161	120
TPB2 biotisch 1	2880	209	75	81	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 2	3003	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	3099	95	23	60	11	11	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch	2994	101	33	47	4	4	<dl
standaarddeviatie	89	85	31	34	5	5	nb
27' abiotisch 1	2498	2372	2149	1974	2016	1579	1588
27' abiotisch 2	2682	2071	1959	1915	1995	1418	1425
27' abiotisch 3	2625	2090	2205	2001	2073	1680	1403
gemiddelde 27' abiotisch	2602	2178	2104	1963	2028	1559	1472
standaarddeviatie	77	138	105	36	33	108	83
27' biotisch 1	2754	844	101	40	35	<dl	5
27' biotisch 2	2921	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	2534	71	22	16	21	9	<dl
gemiddelde 27' biotisch	2736	305	41	18	19	3	2
standaarddeviatie	158	383	43	16	14	4	2

Tabel 5.7: Overzicht concentraties ISOPROPYLBENZEEN (µg/l) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	70	37	31	33	40	16	9
TPB2 abiotisch 2	68	31	37	29	33	25	12
TPB2 abiotisch 3	68	31	38	38	38	24	9
gemiddelde TPB2 abiotisch	69	33	35	33	37	22	10
standaarddeviatie	1	3	3	4	3	4	1
TPB2 biotisch 1	27	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 2	22	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	30	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch	26	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	3	nb	nb	nb	nb	nb	nb
27' abiotisch 1	64	57	46	43	36	31	15
27' abiotisch 2	64	47	54	41	34	23	12
27' abiotisch 3	78	48	<dl	43	30	28	12
gemiddelde 27' abiotisch	69	51	33	28	23	18	9
standaarddeviatie	7	5	24	1	2	3	1
27' biotisch 1	57	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 2	61	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	50	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde 27' biotisch	56	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	5	nb	nb	nb	nb	nb	nb

Tabel 5.8: Overzicht concentraties PROPYLBEZENEEN ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	140	77	66	59	72	18	12
TPB2 abiotisch 2	157	71	70	21	55	28	17
TPB2 abiotisch 3	116	61	83	<5	63	22	11
gemiddelde TPB2 abiotisch	138	70	73	40	63	23	13
standaarddeviatie	17	7	7	19	7	4	3
TPB2 biotisch 1	<dl	<dl	<dl	16	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 2	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch	<dl	<dl	<dl	5	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
27' abiotisch 1	107	104	95	73	59	51	25
27' abiotisch 2	121	89	78	68	58	28	15
27' abiotisch 3	117	94	74	73	41	34	25
gemiddelde 27' abiotisch	115	96	82	72	53	38	22
standaarddeviatie	6	7	9	2	8	10	5
27' biotisch 1	105	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 2	99	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	95	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde 27' biotisch	100	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	4	nb	nb	nb	nb	nb	nb

Tabel 5.9: Overzicht concentraties 1,3,5-TRIMETHYLBENZEEN ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	675	379	236	134	232	131	66
TPB2 abiotisch 2	767	280	342	270	225	190	81
TPB2 abiotisch 3	482	319	352	195	231	157	58
gemiddelde TPB2 abiotisch	641	326	310	200	229	160	68
standaarddeviatie	118	41	52	55	3	24	10
TPB2 biotisch 1	521	283	24	10	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 2	560	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	561	247	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch	547	177	8	3	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	19	126	11	5	nb	nb	nb
27' abiotisch 1	504	446	442	322	184	224	113
27' abiotisch 2	549	373	348	227	205	162	74
27' abiotisch 3	480	375	414	206	183	197	119
gemiddelde 27' abiotisch	511	398	401	251	191	194	102
standaarddeviatie	29	34	39	51	10	26	20
27' biotisch 1	551	258	77	10	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 2	532	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	539	233	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl
gemiddelde 27' biotisch	541	164	26	3	<dl	<dl	<dl
standaarddeviatie	8	116	36	4	nb	nb	nb

Tabel 5.10: Overzicht concentraties 1,2,4-TRIMETHYLBENZEEN ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	1963	1113	946	843	1015	424	255
TPB2 abiotisch 2	1995	929	1042	818	842	572	299
TPB2 abiotisch 3	1835	866	1176	845	954	488	217
gemiddelde TPB2 abiotisch standaarddeviatie	1931 69	969 105	1054 94	836 12	937 72	495 60	257 34
TPB2 biotisch 1	1860	686	542	455	34	30	<dl
TPB2 biotisch 2	1898	<dl	<dl	26	<dl	<dl	<dl
TPB2 biotisch 3	1973	208	53	41	10	<dl	<dl
gemiddelde TPB2 biotisch standaarddeviatie	1911 47	298 287	198 244	165 199	15 14	10 14	<dl nb
27' abiotisch 1	1782	1526	1418	1088	789	745	419
27' abiotisch 2	1898	1248	1141	1058	781	535	282
27' abiotisch 3	1710	1296	1315	1125	771	671	291
gemiddelde 27' abiotisch standaarddeviatie	1797 77	1357 121	1291 114	1090 27	780 7	650 87	331 63
27' biotisch 1	1922	630	361	128	319	10	41
27' biotisch 2	1902	<dl	<dl	13	<dl	<dl	<dl
27' biotisch 3	1742	487	261	56	12	<dl	<dl
gemiddelde 27' biotisch standaarddeviatie	1855 81	372 270	207 152	66 48	110 147	3 5	14 19

Tabel 5.11: Overzicht concentraties MTBE ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	27/05/2004 0 weken	4/08/2004 10 weken	28/08/2004 13 weken	12/10/2004 20 weken	23/11/2004 26 weken	26/01/2005 35 weken	18/02/2005 39 weken
TPB2 abiotisch 1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	557
TPB2 abiotisch 2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	540
TPB2 abiotisch 3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	553
gemiddelde TPB2 abiotisch standaarddeviatie	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	550 7
TPB2 biotisch 1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	600
TPB2 biotisch 2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	510
TPB2 biotisch 3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	607
gemiddelde TPB2 biotisch standaarddeviatie	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	572 44
27' abiotisch 1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	540
27' abiotisch 2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	554
27' abiotisch 3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	469
gemiddelde 27' abiotisch standaarddeviatie	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	521 37
27' biotisch 1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	616
27' biotisch 2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	<dl
27' biotisch 3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	609
gemiddelde 27' biotisch standaarddeviatie	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	nb nb	613 289

De gehalten aan elektronacceptoren (sulfaat, nitraat), metalen (ijzer en mangaan), pH en ORP in de waterfase van de microcosms werden via opofferingsexperimenten aan begin, na 14 en na 41 weken de incubatieperiode gemeten. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 5.12.

Tabel 5.12: pH- en ORP-waarden, concentraties aan elektron-acceptoren, metalen en DOC in de microcosms tijdens de incubatie

	TPB 2 abiotisch			TPB 2 biotisch		
	T0	T2	T7°	T0	T2	T7°
	27/05/2004 0 weken	28/08/2004 14 weken	18/02/2005 41 weken	27/05/2004 0 weken	28/08/2004 14 weken	18/02/2005 41 weken
pH	6,76	6,73	6,64	6,57	7,04	7,08
ORP (mV)	133	-2	-122	254	-117	-156
DIC (mgC/l)	36	35	<100**	45	52	61*
DOC (mgC/l)	2500	-4665	4367	52	40	65*
NO3- (mgN/l)	<dl	<dl	nb	<dl	<dl	nb
SO42- (mg/l)	305	308	317	330	337	345*
Fe (µg/l)	<dl	<dl	<dl	6480	28500	31350*
Mn (µg/l)	7250	7160	7143	6880	8380	8580*
	27' abiotisch			27' biotisch		
	T0	T2	T7°	T0	T2	T7°
	27/05/2004 0 weken	28/08/2004 14 weken	18/02/2005 41 weken	27/05/2004 0 weken	28/08/2004 14 weken	18/02/2005 41 weken
pH	6,3	6,15	5,94	6,53	7,44	6,91
ORP (mV)	316	14	16	172	-31	-146
DIC (mgC/l)	25	<dl	<100**	40	17	46*
DOC (mgC/l)	2495	2760	2100	41	28	22*
NO3- (mgN/l)	<dl	<dl	nb	<dl	3,68	nb
SO42- (mg/l)	297	285	299	308	292	313*
Fe (µg/l)	74	<dl	<dl	2100	<dl	24550*
Mn (µg/l)	7850	8840	8887	7430	7,3	8720*

T0 opoffering flesje 4

T2 opoffering flesje 5

T7 opoffering flesjes 1-2-3: gemiddelde waarde

* gemiddelde waarde van flesjes 1-3, flesje 2 gaf afwijkend resultaat

** verhoogde detectielimiet: kleiner dan 100 mg/l

nb: niet bepaald

De verhoogde DOC-gehalten in de abiotische microcosms zijn te wijten aan het gebruik van formaldehyde om de micro-organismen af te doden.

5.2.3 Conclusies

Na 39 weken incubatie zijn bijna alle BTEX en andere VOC in beide microcosmtesten anaeroob geoxideerd (restconcentraties kleiner dan detectielimiet, d.w.z. <5 µg/l). Enkel voor benzeen werden nog restgehalten gemeten, gesitueerd tussen 10 en 70 µg/l. Deze restconcentraties zijn nog maar een fractie (<10%) van de initieel aanwezige hoeveelheid benzeen.

MTBE is niet afgebroken tijdens de looptijd van de test.

Sulfaat was in hoge gehalten aanwezig maar werd niet gebruikt als elektronacceptor. Bij de levende testcondities nam de concentratie opgelost ijzer(II) toe met de tijd, wat wijst op ijzerreducerende afbraak. Mangaan lijkt geen dienst te doen als elektronacceptor, aangezien de mangaanconcentratie nagenoeg constant blijft tijdens de incubatie.

5.3 Relatie tussen BTEX-afbraak en Fe(III)-reductie

5.3.1 Opzet

De relatie tussen biologische afbraak van BTEX en het verbruik van biobeschikbaar ijzer(III) hebben we onderzocht aan de hand van :

- vergelijking van de restconcentraties Fe(III) op verschillende locaties in het veld
- vergelijking van restconcentraties Fe(III) bij aanvang en op het einde van de laboratoriumafbraaktesten.

In Tabel 5.13 worden de gehalten aan biobeschikbaar Fe(III) weergegeven voor de verschillende bodemonsters van verschillende diepte die tijdens de aquiferstaalname werden verzameld. Het biobeschikbaar Fe(III) werd via 3 verschillende methoden bepaald, de 0,5 M HCL-extractie (en ferrozinebepaling), Ti(III)-EDTA-titratie en *Shewanella*-microcosmtest.

In Figuur 2 vergelijken we de resultaten van de drie bepalingsmethoden voor biobeschikbaar ijzer(III) op grafische wijze voor grondstalen uit boring TPB2.

Na 41 weken werd het gehalte aan biobeschikbaar Fe(III) in elke microcosmos (aquifer 3,0-3,5 m-mv) gemeten via 0,5 M HCl extractie (en ferrozinebepaling) en vergeleken met het oorspronkelijk gehalte voor incubatie (Tabel 5.14)).

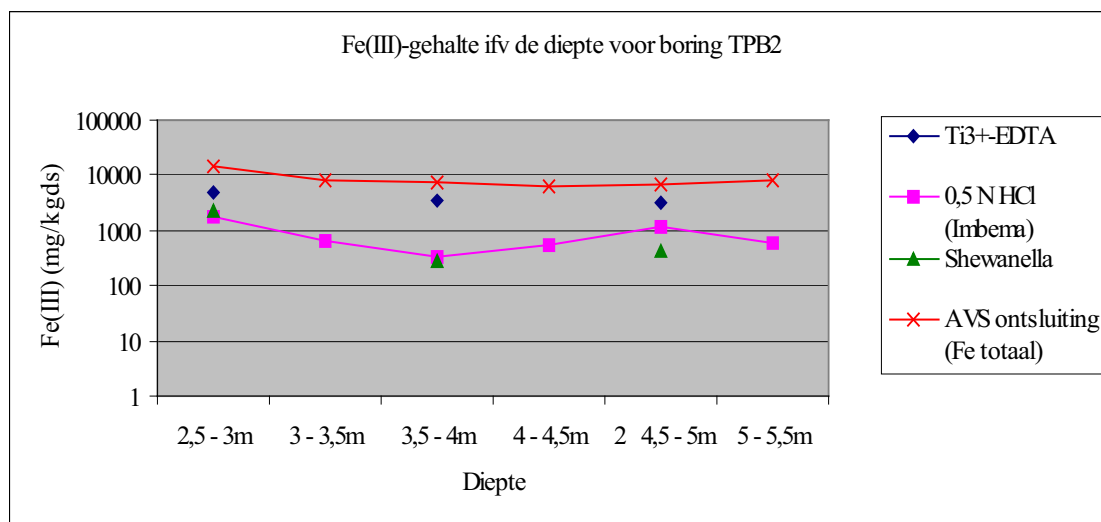
5.3.2 Meetresultaten

Tabel 5.13: Bepaling van het initieel gehalte biobeschikbaar Fe(III) en totaal Fe in de bodemstalen van de site 1 te Mechelen, via 3 verschillende methoden, en op verschillende diepten

Staal	Diepte (m-mv)	Fe III (mg/kgds)			totaal Fe (mg/kgds) 6 N extractie
		Ti(III)-EDTA-extractie *	0,5 M HCl-extractie ferrosine-bepaling	Shewanella-microcosm	
TPB	2,5-2,75	4 130	897 1 010**	590	13 100
	2,75-3,0		580		13 900
	3,5-4,0	4 650	565 610**	1 250	9 750
	4,0-4,5		222 320**		6 550
	4,5-5,0	4 990	498 590**	470	7 840
	5,0-5,5		609		14 100
TPB 2	2,5-3,0	4 720	1 300 2 090**	2 380 2 040	15 300
	3,0-3,5		280 1 010**		16 100
	3,5-4,0	3 420	210 480**	580 0	7 860
	4,0-4,5		551		13 200
	4,5-5,0	3 130	530 1 820**	410	2 880
	5,0-5,5		614		14 100
27'	2,5-3,0		1 606		15 000
	3,0-3,5		851		7 920
	3,5-4,0		870		7 430
	4,0-4,5		729		6 320
	4,5-5,0		319 401		6 670
	5,0-5,5		432 527**		8 270

* berekend uitgaande van de hypothese dat de oxidatiecapaciteit volledig (100%) bepaald wordt door Fe(III)

** een herhaling van de ferrozinemethode werd uitgevoerd 1 maand na eerste meetronde (bovenstaand cijfer): voor de aquiferstalen van TPB en 27' zijn de gemeten concentraties vrij reproduceerbaar; voor de aquiferstalen van TPB 2 is dit niet het geval wat wijst op een vrij grote heterogeniteit van de aquifer.



Figuur 2: Vergelijking van de resultaten voor drie methoden voor bepaling van biobeschikbaar ijzer(III) in aquiferstalen van site 1

Tabel 5.14: Biobeschikbaar Fe(III) (0,5M Cl extractie en ferrozinebepaling) en totaalgehalte petroleumkoolwaterstoffen in de microcosms

	PKWS* (als µg toluen/l)		biobeschikbaar Fe (III) (mg/kgds)	
	0 weken	35 weken	0 weken**	35 weken
TPB2 abiotisch 1	15662	13603		870
TPB2 abiotisch 2	16104	19728		786
TPB2 abiotisch 3	15851	16294		1059
gemiddelde TPB2 abiotisch	15873	16542	1010	905
standaarddeviatie	222	3070		140
TPB2 biotisch 1	14936	10739		239
TPB2 biotisch 2	15346	768		1332
TPB2 biotisch 3	13420	5662		577
gemiddelde TPB2 biotisch	14567	5723	1010	408
standaarddeviatie	1072	3590		239
Seca 27 abiotisch 1	18498	14491		672
Seca 27 abiotisch 2	18251	12865		659
Seca 27 abiotisch 3	16808	14181		744
gemiddelde Seca 27 abiotisch	17852	13846	851	692
standaarddeviatie	913	863		46
Seca 27 biotisch 1	17784	5415		286
Seca 27 biotisch 2	17102	776		811
Seca 27 biotisch 3	18630	4375		316
gemiddelde Seca 27 biotisch	17839	3522	851	301
standaarddeviatie	598	735		21

* totaalconcentratie van alle in het chromatogram aanwezig pieken (zowel minerale olie (niet opgevolgd tijdens de afbraaktest), BTEX, andere VOC en MTBE), bij de berekening wordt uitgegaan van de hypothese dat de Henrycoëfficiënt (headspace meting) en de respons op FID voor alle gedetecteerde stoffen dezelfde zijn als deze van toluen.

** biobeschikbaar ijzer is gemeten in het aquifermateriaal waarmee de microcosmtest is opgezet via de 0,5 M HCl-extractie, gevolgd door ferrozinebepaling

° gemiddelde werd gemaakt van condities 1 en 3, aan gezien conditie 2 een afwijkende waarde vertoont. Er zijn indicaties dat deze microcosms lekten waardoor petroleumkoolwaterstoffen (PKWS) mogelijk vervluchtigden (BTEX-gehalten reeds < 5 µg/l na 1 maand incubatie (tabellen 5.2 en volgende)) en zuurstof in het systeem kwam.

nb: niet bepaald

Het aantal elektronen (in µmol) dat tijdens de afbraaktest door de aanwezige petroleumkoolwaterstoffen (PKWS) werd afgestaan en het aantal door biobeschikbaar Fe(III) opgenomen elektronen werd berekend en vergeleken in Tabel 5.15.

De afname van de PKWS en Fe(III) zoals is telkens berekend t.o.v. de T0-situatie (in de overeenkomstige testconditie) en niet t.o.v. de steriele controle bij de eindbepaling.

Tabel 5.15: Aantal elektronen nodig voor oxidatie petroleumkoolwaterstoffen

	afname PKWS (µg toluen/l)	afgestane e- **(µmol)	afname FeIII (mg/kgds)	opgenomen e- (µmol)
TPB2 biotisch 1	4197	112	771	414
TPB2 biotisch 2*	14578	-	-	-
TPB2 biotisch 3	7758	207	433	232
PB27 biotisch 1	12369	329	565	303
PB27 biotisch 2*	16325	-	-	-
PB27 biotisch 3	14255	380	535	287

* er zijn indicaties dat deze microcosms lekten waardoor petroleumkoolwaterstoffen (PKWS) mogelijk vervluchtigden (BTEX-gehalten reeds < 5 µg/l na 1 maand incubatie (tabellen 5.2 en volgende)) en zuurstof in het systeem kwam (zietabel 5.14: hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) > biobeschikbaar Fe(III) in steriele controle wat wijst op oxidatie van Fe²⁺ aanwezig in de microcosm, alsook de afwijkende resultaten in flesjes 2 voor de gehalten opgelost ijzer en mangaan op einde van de test, tabel 5.12, individuele resultaten flesjes 2 niet mee opgenomen in de berekening)

** aantal uitgewisselde elektronen indien PKWS volledig geoxideerd worden.

5.3.3 Conclusies

Vergelijking van de analytische methodes voor bepaling van ijzer(III)

De biobeschikbare ijzergehaltes en de resultaten van de afbraaktesten zijn niet significant verschillend tussen het aquifermateriaal van TPB 2 en 27'.

Uit de resultaten in Tabel 5.13 en Figuur 2 blijkt dat de concentraties aan biobeschikbaar Fe(III) bekomen met de 0,5 M HCl-extractie vergelijkbaar zijn met de gehalten die bepaald werden met de *Shewanella*-testkit.

De ***Shewanella*-testkit** heeft als voordeel dat het een commercieel beschikbare, gestandaardiseerde microcosmtest is, gebaseerd op biologische activiteit. Een belangrijk nadeel is echter de vrij lange incubatietijd van 1 maand alvorens de resultaten beschikbaar zijn. Het voordeel van de **0,5 M HCl extractie** is dat het een eenvoudige test is, die reeds na 48 u betrouwbare resultaten levert. De ferrozinebepaling is bovendien stabiel en reproduceerbaar (zie Annex C).

De **Ti(III)-EDTA-methode** gaf een overschatting van het biobeschikbaar Fe(III) in vergelijking met de twee voorgenoemde methoden. Deze methode bepaalt immers het totaal oxiderend vermogen van het bodemstaal en niet enkel biobeschikbaar Fe(III). Bovendien is deze methode vrij omslachtig om uit te voeren, aangezien de titratie onder N₂-atmosfeer moet gebeuren. Bovendien is de kleuromslag van de indicator niet altijd eenduidig vast te stellen in de extracten.

Relatie tussen afbraak en verbruik van ijzer(III)

Aangezien het een eenvoudige methode betreft, die vergelijkbare resultaten geeft met de *Shewanella*-testkit, werd de 0,5 M HCl-extractie gebruikt om het verbruik van Fe(III) gedurende de BTEX-afbraaktest na te gaan.

In alle microcosms is het gehalte aan Fe(III) na incubatie afgenomen t.o.v. het oorspronkelijke gehalte aan Fe(III), maar deze afname is groter in de levende microcosms, dan in de dode, wat aantoont dat de functionele elektronacceptor (oxidans) voor de biologische afbraak ijzer(III) was. Reductie van mangaan was weinig belangrijk. Het grondwater bevatte ook veel sulfaat, maar dat werd niet gebruikt als elektronacceptor.

Uit de test blijkt bovendien dat de door petroleumkoolwaterstoffen afgestane hoeveelheid elektronen in goede overeenstemming is met de door het biobeschikbaar Fe(III) opgenomen hoeveelheid elektronen. Deze vaststelling bevestigt de bruikbaarheid van de 0,5M HCl-extractie met ferrozinebepaling voor het inschatten van de duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van BTEX met Fe(III) als elektronacceptor.

Betekenis voor de sanering van de testlocatie

Uit de resultaten kunnen we besluiten dat natuurlijke attenuatie van BTEX optreedt op deze site, met Fe(III) als elektronacceptor. Uit de stoichiometrie van de anaerobe afbraakreactie (paragraaf 4.4) kan worden afgeleid dat per mol toluen 5,14 mol biobeschikbaar Fe(III) wordt gereduceerd. Bij benadering (in de veronderstelling dat alle BTEX aanwezig zijn onder de vorm van toluen) kan dus gesteld worden dat voor de volledige afbraak van een vuilvracht van 1 mg BTEX (tolueen) theoretisch 21,84 mg biobeschikbaar Fe(III) dient aanwezig te zijn in de bodem.

Gesteld dat de maximale grondwaterconcentratie aan BTEX in de pluimzone 800 µg/l bedraagt, betekent dit dat het gehalte aan biobeschikbaar Fe(III) in de pluimzone theoretisch minstens 3,1 mg/kgds dient te bedragen (bulkdensiteit 1700 kgds/m³, 30% porositeit). In de bronzone, waar een gehalte van 29000 µg/L vluchtige petroleumkoolwaterstoffen is gemeten in TPB2, zou er tenminste 112 mg/kg biobeschikbaar ijzer(III) nodig zijn. Hieraan wordt voldaan voor deze gevalstudie.

In realiteit dient men een voldoende veiligheidsmarge te voorzien, aangezien Fe(III) en verontreiniging heterogeen verspreid voorkomen, er nog verontreiniging gesorbeerd is aan de bodem en Fe(III) eveneens door andere bodemprocessen

kan worden gereduceerd. Men dient hierbij ook rekening te houden met de totale vuilvracht die moet afgebroken worden om de pluim te doen inkrimpen en met de beschikbaarheid van andere elektronacceptoren die bacteriën kunnen gebruiken om BTEX af te breken (zuurstof en eventueel nitraat, sulfaat, mangaan en kooldioxide).

Op basis van de resultaten van de labotesten merken we op dat natuurlijke attenuatie onder anaerobe condities kansvol is voor de grondwaterverontreiniging met BTEX en gesubsitueerde C9-C10-benzenen, maar niet in aanmerking komt voor de grondwaterverontreiniging met MTBE die op deze site is vastgesteld.

5.3.4 Vergelijking met de reële situatie op de testsite

Dit is voor deze site niet van toepassing omdat er na de grondbemonstering en veldmetingen van VITO een ontgraving van de bodemverontreiniging is uitgevoerd en een grondwatersanering op basis van pump & treat is opgestart.

6 Site 2 te Mortsel

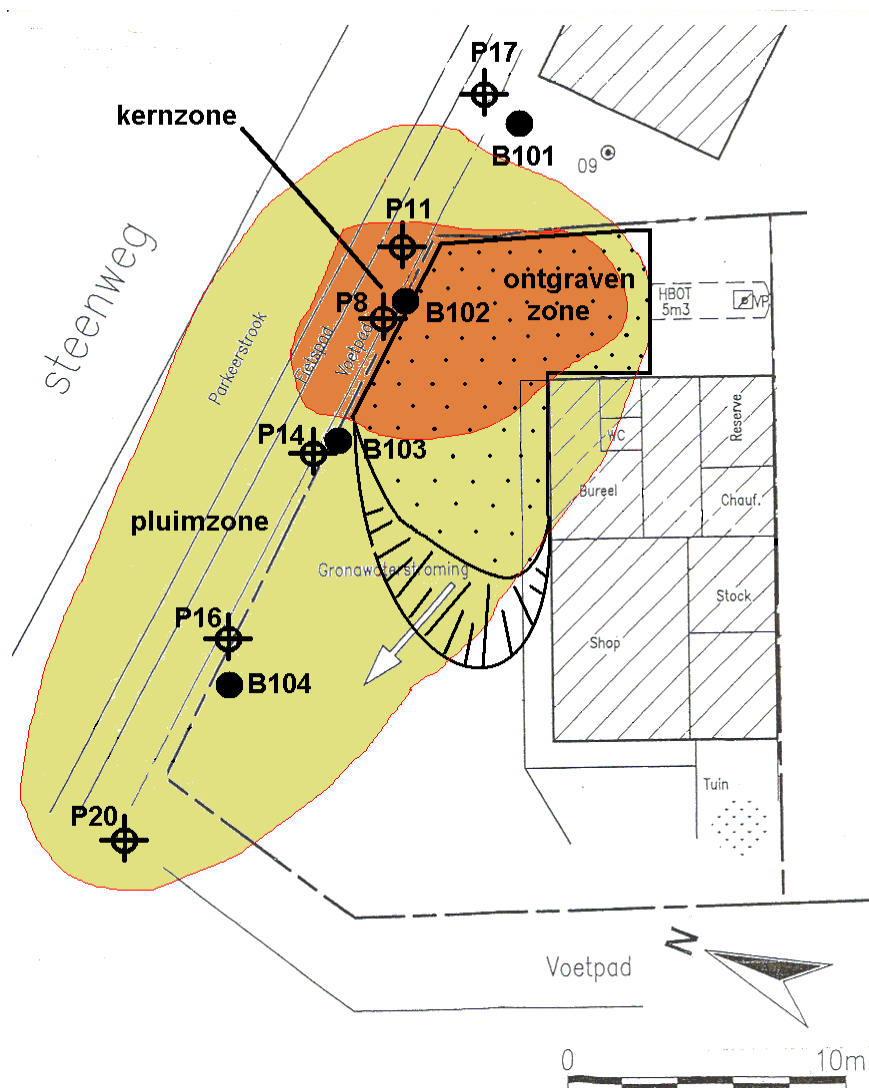
6.1 Karakterisatie van de site

Site 2 te Mortsel heeft een grond- en grondwaterverontreiniging met minerale olie en BTEX, afkomstig van ondergrondse brandstoftanks. In de kernzone is puur product aanwezig. De kernzone werd maximaal ontgraven en een gedeelte van de drijf laag werd verwijderd. Een restverontreiniging is achtergebleven op het terrein zelf en onder de openbare weg. Deze restverontreiniging wordt verder gemonitord.

De aquiferstalen werden op vier verschillende locaties genomen:

- B101, ter hoogte van P17 (stroomopwaarts van de verontreiniging);
- B102, ter hoogte van P8 en P11 (in de verontreinigingskern);
- B103, ter hoogte van P14 (halverwege de pluim);
- B104, ter hoogte van P16 (uiteinde van de pluim).

De grondwaterstalen zijn afkomstig uit de bestaande peilbuizen P17, P11, P14 en P16.



Figuur 3: Situatieschets site 2 te Mortsel

De staalname van grondwater en aquifer materiaal werd door VITO uitgevoerd op 21/03/2007 en 04/04/2007.

De boringen werden telkens uitgevoerd m.b.v. een Geoprobe tot op een diepte van 7 m-mv, waarbij tussen 3 en 7 m-mv per meter ongestoorde en anaerobe bodemstalen werden genomen in liners. De liners werden naar VITO getransporteerd en gekoeld onder stikstof bewaard.

In B102 werd in het veld een sterke benzinegeur waargenomen vanaf 2,5 m-mv. Ter hoogte van de grondwatertafel was puur product aanwezig in de bodemporiën.

De grond- en waterstalen werden voorafgaandelijk gekarakteriseerd. De resultaten worden weergegeven in Tabel 6.1.

Tabel 6.1 Karakterisatie van het grondwater van de site 2 te Mortsel

	P11	P14	P16	P17
Staalnamedatum	24/03/2007	24/03/2007	24/03/2007	24/03/2007
Waterstand (m-mv)	3,91	3,95	4,00	3,89
Veldanalyses				
T (°C)	12,1	12,7	12	12,7
pH	6,53	6,23	6,18	5,65
Conductiviteit (µS/cm)	965	1205	464	556
ORP (mV)	24	45	67	185
DO (mg/l)	1,65	3,71	1,25	2,08
Laboanalyses				
DIC (mgC/l)	110,2	118,2	46,71	10,66
DOC (mgC/l)	19	6,8	2,51	<5
TOC (mgC/l)	129,2	125	49,22	10,59
Nitraat -N (mg N/l)	<0,23	<0,23	<0,23	2,4
Sulfaat (mg/l)	4,3	80	140	170
Metalen				
Fe (µg/l)	41200	12900	11600	709
Mn (µg/l)	1600	79	308	27
Koolwaterstoffen				
Fractie <C6 (%)	2	36	34	-
Fractie C6-C8 (%)	48	51	26	-
Fractie C8-C10 (%)	45	6	34	-
Fractie > C10 (%)	5	7	5	-
Gehalte <C6 - C12 (µg/l)	110000*	2400	1700	<250
Fractie C10-C12 (%)	89	-	<1	-
Fractie C12-C20 (%)	7	-	<1	-
Fractie C20-C30 (%)	<1	-	72	-
Fractie C30-C40 (%)	4	-	28	-
Gehalte C10-C40 (µg/l)	1800	<100	4400	<100

	P11	P14	P16	P17
Vluchtige organische solventen (µg/l)				
benzeen	8000	660	81	<dl
tolueen	31000	3,7	370	<dl
ethylbenzeen	6400	5,5	81	<dl
m+p-xyleen	13000	<dl	180	<dl
o-xyleen	5900	<dl	73	<dl
styreen	790	<dl	8,3	<dl
naftaleen	350	<dl	<dl	<dl
n-hexaan*	130	<dl	<dl	<dl
n-heptaan*	35	<dl	<dl	<dl
n-octaan*	<dl	<dl	<dl	<dl
MTBE	270	270	<dl	<dl
1,2,4-trimethylbenzeen	1900	<dl	38	<dl
1,3,5-trimethylbenzeen	740	<dl	11	<dl
propylbenzeen	360	<dl	4,9	<dl
iso-propylbenzeen	150	2,2	<dl	<dl
sec.butylbenzeen	9	<dl	<dl	<dl
tert.butylbenzeen	<dl	<dl	<dl	<dl
n-butylbenzeen	71	<dl	<dl	<dl
p-isopropyltolueen	2,6	<dl	<dl	<dl

* onbetrouwbare waarde: puur product aanwezig

<dl : kleiner dan detectielimiet

6.2 Afbraaktesten

6.2.1 Opzet

Er werden twee microcosmtesten opgestart met aquifermateriaal afkomstig van respectievelijk B103 en B104 uit de verontreinigingspluim. Voor beide microcosms werd telkens een mengstaal gemaakt van het bodemmateriaal tussen 4,0 en 5,5 m-mv, onder de grondwatertafel. Beide aquiferstalen werden gekozen omwille van hun locatie op verschillende afstand van de kern. B102 (kern) werd niet geschikt geacht wegens het voorkomen van een drijf laag.

Voor beide testen werd grondwater van peilbuis P16 (nabij B104) gebruikt, waaraan voorafgaandelijk BTEX werden toegevoegd.

In beide microcosmtesten werden twee testcondities onderzocht, elk in 6-voud:

- een abiotische controle met toevoeging van een inhibitor voor microbiële activiteit;
- een levende testconditie (natuurlijke attenuatie).

6.2.2 Meetresultaten

Periodiek werden er chemische analyses (elektronacceptoren, metalen en DOC) op het grondwater van de microcosms uitgevoerd. In de headspace van de microcosms werden VOC-gehalten gemeten via GC/FID/FID. De resultaten zijn voorgesteld in de volgende tabellen.

Verklaring van onderstaande tabellen:

* Wegens breken van flesje 2 werden de metingen na 7 en 10 weken op flesje 4 verricht

< dl: waarde kleiner dan detectielimiet

nb: niet bepaald

Tabel 6.2: Overzicht concentraties BENZEEN($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	23/04/2007	21/05/2007	14/06/2007	5/07/2007
	0 weken	4 weken	7 weken	10 weken
B103 abiotisch 1	2929	2831	2626	2797
B103 abiotisch 2*	2970	nb	2081	2084
B103 abiotisch 3	2946	2251	2030	1986
gemiddelde B103 abiotisch standaarddeviatie	2948 17	2541 290	2246 270	2289 361
B103 biotisch 1	3051	2340	8	<dl
B103 biotisch 2	3070	2198	<dl	<dl
B103 biotisch 3	3237	2537	9	<dl
gemiddelde B103 biotisch standaarddeviatie	3120 84	2358 139	6 4	<dl nb
B104 abiotisch 1	3115	3060	3133	2603
B104 abiotisch 2	3141	2912	2641	2562
B104 abiotisch 3	3063	2967	2695	2657
gemiddelde B104 abiotisch standaarddeviatie	3107 32	2980 61	2823 220	2607 39
B104 biotisch 1	3502	2084	<dl	<dl
B104 biotisch 2	3399	2471	1	<dl
B104 biotisch 3	3302	2179	<dl	<dl
gemiddelde B104 biotisch standaarddeviatie	3401 82	2244 165	<1 nb	<dl nb

Tabel 6.3: Overzicht concentraties TOLUEEN (µg/l) in microcosms

Datum	23/04/2007 0 weken	21/05/2007 4 weken	14/06/2007 7 weken	5/07/2007 10 weken
B103 abiotisch 1	2940	2773	2637	2728
B103 abiotisch 2*	2965	nb	1657	1594
B103 abiotisch 3	2953	1567	1216	1116
gemiddelde B103 abiotisch standaarddeviatie	2953 10	2170 603	1837 594	1813 676
B103 biotisch 1	3074	14	<dl	<dl
B103 biotisch 2	3087	55	<dl	<dl
B103 biotisch 3	3271	26	<dl	<dl
gemiddelde B103 biotisch standaarddeviatie	3144 90	32 17	<dl nb	<dl nb
B104 abiotisch 1	3154	3022	3093	2582
B104 abiotisch 2	3185	2760	2394	2189
B104 abiotisch 3	3112	2828	2508	2401
gemiddelde B104 abiotisch standaarddeviatie	3151 30	2870 111	2665 306	2391 161
B104 biotisch 1	3488	<dl	<dl	<dl
B104 biotisch 2	3368	<dl	<dl	<dl
B104 biotisch 3	3282	<dl	<dl	<dl
gemiddelde B104 biotisch standaarddeviatie	3379 84	<dl nb	<dl nb	<dl nb

Tabel 6.4: Overzicht concentraties ETHYLBENZEEN (µg/l) in microcosms

Datum	23/04/2007 0 weken	21/05/2007 4 weken	14/06/2007 7 weken	5/07/2007 10 weken
B103 abiotisch 1	2562	2290	2155	2250
B103 abiotisch 2*	2546	nb	1097	1026
B103 abiotisch 3	2546	823	525	469
gemiddelde B103 abiotisch standaarddeviatie	2552 8	1557 733	1259 675	1248 744
B103 biotisch 1	2697	995	225	<dl
B103 biotisch 2	2681	354	<dl	<dl
B103 biotisch 3	2854	1378	512	<dl
gemiddelde B103 biotisch standaarddeviatie	2744 78	909 422	246 210	<dl nb
B104 abiotisch 1	2736	2531	2537	2142
B104 abiotisch 2	2781	2182	1759	1515
B104 abiotisch 3	2719	2237	1880	1748
gemiddelde B104 abiotisch standaarddeviatie	2745 26	2317 153	2059 342	1802 259
B104 biotisch 1	3155	2231	999	34
B104 biotisch 2	3044	1850	96	<dl
B104 biotisch 3	2933	1945	79	<dl
gemiddelde B104 biotisch standaarddeviatie	3044 91	2008 162	391 430	11 16

Tabel 6.5: Overzicht concentraties m- en p-XYLEEN ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	23/04/2007 0 weken	21/05/2007 4 weken	14/06/2007 7 weken	5/07/2007 10 weken
B103 abiotisch 1	1693	1364	1285	1347
B103 abiotisch 2*	1586	nb	677	639
B103 abiotisch 3	1568	491	309	276
gemiddelde B103 abiotisch standaarddeviatie	1615 55	927 437	757 402	754 445
B103 biotisch 1	1657	577	1	<dl
B103 biotisch 2	1656	33	<dl	<dl
B103 biotisch 3	1773	22	<dl	<dl
gemiddelde B103 biotisch standaarddeviatie	1695 55	210 259	<1 nb	<dl nb
B104 abiotisch 1	1685	1503	1512	1285
B104 abiotisch 2	1718	1308	1058	923
B104 abiotisch 3	1671	1332	1122	1056
gemiddelde B104 abiotisch standaarddeviatie	1691 20	1381 87	1231 201	1088 149
B104 biotisch 1	1915	14	<dl	<dl
B104 biotisch 2	1858	14	<dl	<dl
B104 biotisch 3	1774	14	<dl	<dl
gemiddelde B104 biotisch standaarddeviatie	1849 58	14 0	<dl nb	<dl nb

Tabel 6.6: Overzicht concentraties o-XYLEEN ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	23/04/2007 0 weken	21/05/2007 4 weken	14/06/2007 7 weken	5/07/2007 10 weken
B103 abiotisch 1	4100	3730	3610	3736
B103 abiotisch 2*	4210	nb	2212	2117
B103 abiotisch 3	4204	1648	1119	1010
gemiddelde B103 abiotisch standaarddeviatie	4171 50	2689 1041	2314 1019	2288 1120
B103 biotisch 1	4387	1554	4	15
B103 biotisch 2	4357	1366	<dl	<dl
B103 biotisch 3	4673	2286	<dl	<dl
gemiddelde B103 biotisch standaarddeviatie	4472 142	1735 397	1 2	5 7
B104 abiotisch 1	4454	4123	4199	3640
B104 abiotisch 2	4500	3668	3166	2838
B104 abiotisch 3	4391	3700	3255	3114
gemiddelde B104 abiotisch standaarddeviatie	4448 45	3830 207	3540 467	3197 332
B104 biotisch 1	5106	<dl	<dl	<dl
B104 biotisch 2	4901	<dl	<dl	<dl
B104 biotisch 3	4732	<dl	<dl	<dl
gemiddelde B104 biotisch standaarddeviatie	4913 153	<dl nb	<dl nb	<dl nb

In tegenstelling tot de analyseresultaten voor minerale olie uit tabel 6.1 (P16), werden tijdens de opvolging van de afbraaktest (waarbij extra BTEX aan de microcosms werd toegevoegd) enkel BTEX-pieken waargenomen in de analysespectra. Hierdoor kan het totaal gehalte KWS gelijkgesteld worden aan het totaalgehalte aan BTEX.

Tabel 6.7: Overzicht totaal gehalte vluchtige KWS ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	23/04/2007 0 weken	21/05/2007 4 weken	14/06/2007 7 weken	5/07/2007 10 weken
B103 abiotisch 1	14224	12988	12313	12858
B103 abiotisch 2*	14278	nb	7724	4857
B103 abiotisch 3	14217	6780	5199	7461
gemiddelde B103 abiotisch standaarddeviatie	14240 27	9884 3104	8412 2945	8392 3332
B103 biotisch 1	14866	5481	238	15
B103 biotisch 2	14852	4005	<dl	<dl
B103 biotisch 3	15808	6250	521	<dl
gemiddelde B103 biotisch standaarddeviatie	15175 447	5245 932	253 213	5 7
B104 abiotisch 1	15145	14239	14474	12252
B104 abiotisch 2	15325	12830	11018	10027
B104 abiotisch 3	14956	13064	11460	10976
gemiddelde B104 abiotisch standaarddeviatie	15142 150	13378 617	12317 1536	11085 912
B104 biotisch 1	17166	4329	999	34
B104 biotisch 2	16570	4335	97	<dl
B104 biotisch 3	16023	4138	79	<dl
gemiddelde B104 biotisch standaarddeviatie	16586 467	4267 91	391 430	11 16

Tabel 6.8: Overzicht concentraties MTBE ($\mu\text{g/l}$) in microcosms

Datum	23/04/2007 0 weken**	21/05/2007 4 weken	14/06/2007 7 weken	5/07/2007 10 weken
B103 abiotisch 1	5236	981	943	1003
B103 abiotisch 2*	6438	nb	895	931
B103 abiotisch 3	5564	916	906	961
gemiddelde B103 abiotisch standaarddeviatie	5746 507	948 33	915 21	965 30
B103 biotisch 1	1108	1106	1034	1081
B103 biotisch 2	1074	989	916	1011
B103 biotisch 3	1149	1037	1057	1024
gemiddelde B103 biotisch standaarddeviatie	1110 31	1044 48	1002 62	1038 30
B104 abiotisch 1	5181	886	898	812
B104 abiotisch 2	5490	834	814	847
B104 abiotisch 3	4781	840	770	821
gemiddelde B104 abiotisch standaarddeviatie	5151 291	853 23	827 53	827 15
B104 biotisch 1	982	932	970	966
B104 biotisch 2	969	994	1029	1028
B104 biotisch 3	940	987	930	908
gemiddelde B104 biotisch standaarddeviatie	964 17	971 28	976 41	968 49

** Door een onduidelijke scheiding van pieken, werd de concentratie aan MTBE overschat op T0. In de volgende meetrondes werd de analysetechniek licht gewijzigd, waardoor de MTBE piek beter te onderscheiden was.

De gehalten aan elektronacceptoren (sulfaat, nitraat), metalen (ijzer en mangaan), pH en ORP in de waterfase van de microcosms werden via opofferings-experimenten aan het begin (0 weken) en het einde (10 weken) van de incubatieperiode gemeten. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 6.9.

De negatieve redoxpotentialen op het einde van de test geven aan dat anaërobe condities zijn gehandhaafd over de looptijd van de test. De afname van de ORP in de steriele controle kan mogelijk toegeschreven worden aan het reducerend karakter van formaldehyde dat werd toegevoegd om de micro-organismen af te doden. De verhoogde DOC-gehalten in de abiotische microcosms zijn te wijten aan het gebruik van formaldehyde.

Tabel 6.9: pH- en ORP-waarden, concentraties aan elektron-acceptoren, metalen en DOC in de microcosms tijdens de incubatie

	B103 abiotisch		B103 biotisch		B104 abiotisch		B104 biotisch	
	T0	T3	T0	T3	T0	T3	T0	T3
	18/04/2007 0 weken	10/07/2007 10 weken	18/04/2007 0 weken	10/07/2007 10 weken	18/04/2007 0 weken	10/07/2007 10 weken	18/04/2007 0 weken	10/07/2007 10 weken
pH	6,42	5,47	6,71	6,05	6,54	5,57	6,93	6,08
ORP (mV)	329	-182	-210	-51	338	-146	-226	-70
DC (mgC/l)	2160	nb	29,17	nb	1710	nb	37,06	nb
DIC (mgC/l)	12,32	nb	18,98	nb	15,52	nb	23,1	nb
DOC (mgC/l)	2150	1900	10,19	6,1	1690	1800	13,96	6,1
NO ₃ - (mgN/l)	<dl	<dl	<dl	<dl	0,45	<dl	<dl	<dl
NO ₂ - (mgN/l)	<dl	<dl	0,05	<dl	0,04	<dl	<dl	<dl
SO ₄ ²⁻ (mg/l)	120	115	120	128	130	126	130	135
Fe (µg/l)	26	2190	135	1627	<dl	24	<dl	545
Mn (µg/l)	395	1032	352	506	378	684	250	444

T0 opoffering flesje 5

T3 opoffering flesjes 1-2-3: gemiddelde waarde

<dl: kleiner dan detectielimiet

nb: niet bepaald

6.2.3 Conclusies

Na 10 weken incubatie zijn praktisch alle BTEX in beide microcosmtesten anaeroob geoxideerd. De hoeveelheid alkanen in de stalen was verwaarloosbaar, waardoor deze buiten beschouwing werden gelaten.

MTBE is niet afgebroken tijdens de looptijd van de test.

Sulfaat werd niet gebruikt als elektronacceptor. De gehalten aan Fe en Mn nemen toe tijdens de incubatie, zowel in de abiotische als de biotische microcosms. In de steriele controles zou dit kunnen veroorzaakt zijn door nevenreacties als gevolg van de hoge concentraties formaldehyde.

6.3 Relatie tussen BTEX-afbraak en Fe(III)-reductie

6.3.1 Opzet

De relatie tussen biologische afbraak van BTEX en het verbruik van biobeschikbaar ijzer(III) hebben we onderzocht aan de hand van :

- vergelijking van de restconcentraties Fe(III) op verschillende locaties in het veld
- vergelijking van restconcentraties Fe(III) bij aanvang en op het einde van de laboratoriumafbraaktesten.

In Tabel 6.10 worden de gehalten aan biobeschikbaar ijzer(III) weergegeven voor de verschillende aquifermonsters die in het veld zijn genomen op 4 locaties (stroomopwaarts, in de bronzone, net stroomafwaarts van de bronzone en in de pluimzone). Het biobeschikbaar Fe(III) werd via 3 verschillende methoden bepaald.

In Figuur 4 geven we het verloop van de gehalten Fe(III) weer voor deze vier locaties en voor verschillende dieptetrajecten tussen de grondwatertafel en twee meter daaronder.

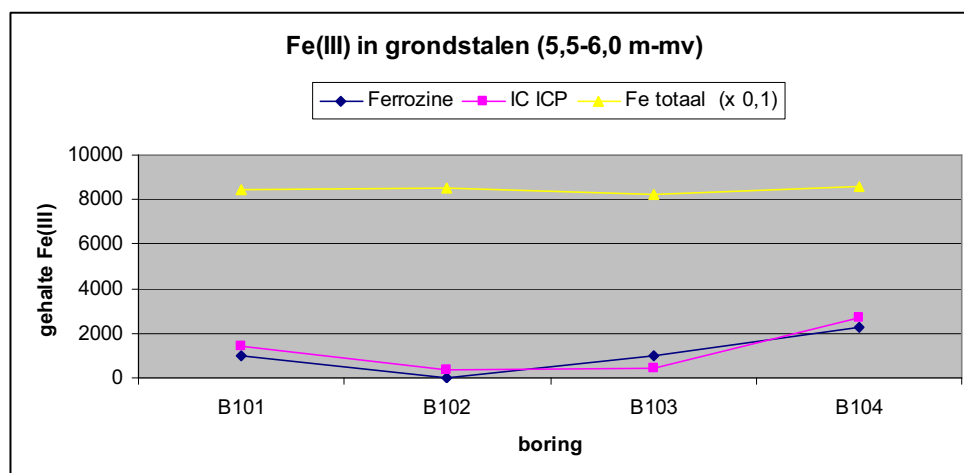
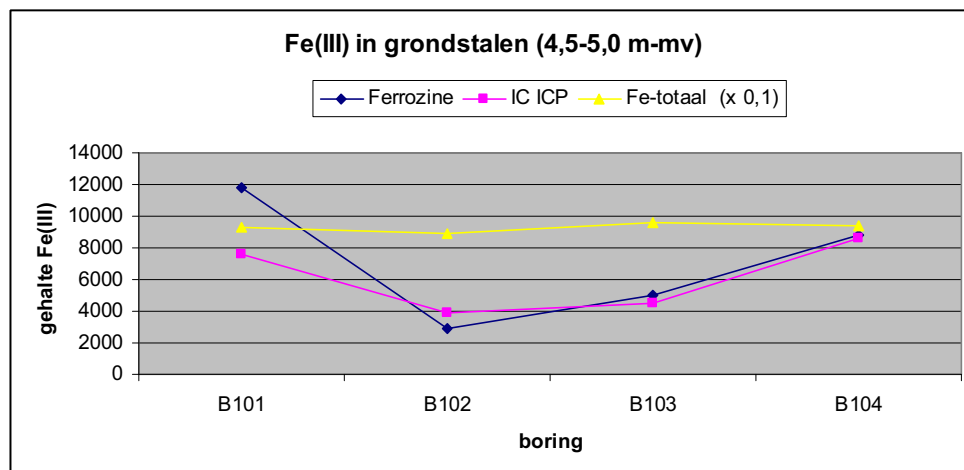
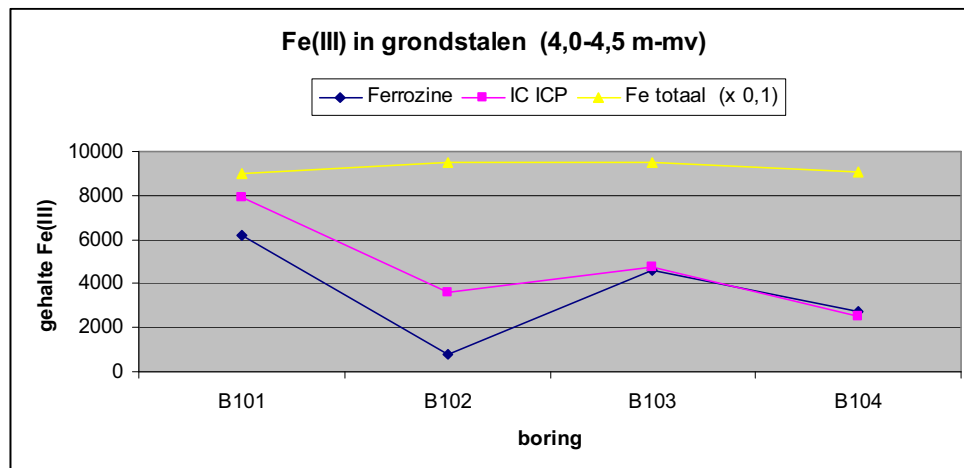
In Tabel 6.11 worden de initiële gehalten Fe(II), Fe(III) en Fe_{totaal} volgens de 0,5 M HCl extractie voor beide microcosms weergegeven. Aangezien beide microcosms bestaan uit een mengstaal van evenredige hoeveelheden bodemmateriaal afkomstig van de verschillende substalen, werd telkens het gemiddelde gemaakt van de ijzergehalten van de substalen.

Na BTEX-afbraak werd het gehalte aan biobeschikbaar Fe(III) in elke microcosmos opnieuw gemeten via 0,5 M HCl extractie en vergeleken met het oorspronkelijk gehalte voor incubatie (Tabel 6.12 en Tabel 6.13).

6.3.2 Meetresultaten

Wanneer men de resultaten bekijkt van de bepalingen van biobeschikbaar ijzer(III) in aquiferstalen die zijn genomen op verschillende diepten dan valt het op dat de diepere bodemstalen die permanent verzadigd zijn duidelijk lagere gehalten aan Fe(III) bevatten. Dit kan worden toegeschreven aan de strikt anaerobe condities die er heersen. De totale ijzergehalten zijn daarentegen vrij constant met de diepte.

Figuur 4 geeft aan dat het gehalte biobeschikbaar ijzer(III) in grondstalen die zijn genomen tussen 4 en 5 m-mv voor de bronzone (B102) en net stroomafwaarts daarvan (B103) is verlaagd ten opzichte van dat in de niet verontreinigde stroomopwaartse zone (B101)



Figuur 4 : Grafische weergave van het verloop van het gehalte biobeschikbaar ijzer(III) in aquiferstalen van site 2.

Tabel 6.10: Bepaling van het initieel gehalte aan biobeschikbaar Fe(III) en totaal Fe in de bodemstalen van de site 2 te Mortsel, via 3 verschillende methoden

Staal	Diepte (m-mv)	Fe III (mg/kgds)				Shewanella-microcosm	totaal Fe (mg/kgds) 6 N extractie
		Ti(III)-EDTA-extractie *	ferrosine-bepaling	0,5 M HCl-extractie IC-ICP			
B101A	3,5-4,0	-	2902	4201	-	81800	
B101B	4,0-4,5	4339**	6191	7888	2202'	89700	
B101C	4,5-5,0	-	11757	7552	-	92900	
B101D	5,5-6,0	5082**	968	1430	237'	84600	
B101E	6,0-6,5	-	0°	498	-	85000	
B101F	6,5-7,0	2266	0°	540	68	86600	
B102A	3,5-4,0	-	0°	2863	-	82500	
B102B	4,0-4,5	4747**	818	3564	1187'	95000	
B102C	4,5-5,0	-	2932	3859	-	89400	
B102D	5,5-6,0	5017	0°	330	0°	84900	
B102E	6,0-6,5	-	0°	459	-	87400	
B102F	6,5-7,0	1752	0°	360	16	83200	
B103A	3,5-4,0	-	2583	2814	-	78600	
B103B	4,0-4,5	4346**	4577	4748	1670'	94700	
B103C	4,5-5,0	-	5020	4455	-	96200	
B103D	5,5-6,0	2485	1000	396	0°	82500	
B103E	6,0-6,5	-	0°	319	-	88400	
B103F	6,5-7,0	1537	0°	366	0°	84800	
B104A	3,5-4,0	-	2224	2108	-	44200	
B104B	4,0-4,5	4769**	2752	2508	1117'	90500	
B104C	4,5-5,0	-	8756	8641	-	94400	
B104D	5,5-6,0	4592**	2273	2670	862'	85600	
B104E	6,0-6,5	-	0°	354	-	84900	
B104F	6,5-7,0	2757	0°	351	7	85500	

* berekend uitgaande van de hypothese dat de oxidatiecapaciteit volledig (100%) bepaald wordt door Fe(III)

** onduidelijk omslagpunt

° berekening gaf negatieve waarde

' tijdens de Shewanella-microcosmtest werd er > 20% verschil gemeten tussen de begin- en eindconcentratie totaal Fe,

Tabel 6.11 toont de initiële ijzerspeciatie in de verschillende aquiferstalen die gebruikt werden om het mengstaal voor de aanmaak van de microcosms samen te stellen. Aangezien van elk dieptestaal evenveel materiaal werd toegevoegd aan het mengstaal, kan de gemiddelde ijzerspeciatie van de verschillende deelstalen beschouwd worden als de initiële speciatie van de microcosms.

Tabel 6.11: Initiële Fe-speciatie in de microcosms (0,5M HCl extractie)

Substaal	diepte (m-mv)	Concentratie grond (mg/kgds)		
		Fe II	Fe III	Fe tot
B103B	4,0-4,5	1047	4748	6748
B103C	4,5-5,0	579	4455	5633
B103D	5,0-5,5	4907	396	6460
gemiddelde microcosm 103		2178	3200	6280
B104B	4,0-4,5	100	2508	2971
B104C	4,5-5,0	256	8641	10182
B104D	5,0-5,5	968	2670	4112
gemiddelde microcosm 104		441	4606	5755

In Tabel 6.12 wordt de initiële ijzerspeciatie in de microcosms (T0) vergeleken met de speciatie na het afbraakexperiment (T3) en dit zowel voor de biotische als de abiotische conditie. We merken op dat Fe totaal niet overeenstemt met de som van Fe(II) en Fe(III), wat wordt toegeschreven aan het feit dat Fe totaal een aparte bepaling betreft (met bijhorende meetfouten).

Tabel 6.12: Fe-speciatie in de microcosms voor en na incubatie (0,5M HCl extractie)

Substaal	T0 (mg/kgds)			T3 (abiotisch) (mg/kgds)			T3 (biotisch) (mg/kgds)		
	Fe II	Fe III	Fe tot	Fe II	Fe III	Fe tot	Fe II	Fe III	Fe tot
1	nb	nb	nb	3425	2075	5730	3718	1678	5401
2	nb	nb	nb	3329	2715	6088	4041	1662	5736
3	nb	nb	nb	3660	2205	5874	3618	1948	5622
gemiddelde microcosm 103	2178	3200	6280	3471	2332	5897	3792	1763	5586
standaarddeviatie	nb	nb	nb	139	277	147	181	131	139
1	nb	nb	nb	811	2705	3392	1470	2589	3872
2	nb	nb	nb	960	3034	3907	1478	2947	4269
3	nb	nb	nb	1196	4169	5200	1743	3353	4900
gemiddelde microcosm 104	441	4606	5755	989	3303	4166	1564	2963	4347
standaarddeviatie	nb	nb	nb	158	627	760	127	312	423

nb: niet bepaald

Uit deze resultaten blijkt dat de gemeten totaalgehaltenes voor ijzer (Fe_{tot}) in microcosm 103 vrij goed overeenstemmen voor en na incubatie en tussen de replica's onderling, terwijl de overeenstemming voor microcosm 104 iets minder goed is. In alle microcosms is het gehalte aan Fe(III) na incubatie afgenomen t.o.v. het oorspronkelijke gehalte aan Fe(III). Voor microcosm 103 is deze afname iets groter in de levende microcosms dan in de dode, wat aantoont dat de biotische afbraakprocessen van BTEX gebruik maken van Fe(III) als elektron-acceptor. Voor microcosm 104 lijkt dezelfde trend zichtbaar, doch deze afname is ten gevolge van de grote standaarddeviatie niet significant verschillend ten opzichte van de steriele controle. Op absolute basis is er echter wel significante toename van Fe(II) en verbruik van Fe(III) voor microcosm 104 ... Het is mogelijk dat in de steriele

controle ook reductie van ijzer-III tot ijzer-II is opgetreden door het toegevoegde formaldehyde.

Tabel 6.13: Biobeschikbaar ijzer en totaalgehalte BTEX in de microcosms

	BTEX (som) ($\mu\text{g/l}$)		Fe(III) (mg/kgds)	
	0 weken	10 weken	0 weken	10 weken
B103 abiotisch 1	14224	12858	nb	2075
B103 abiotisch 2*	14278	7461	nb	2715
B103 abiotisch 3	14217	4857	nb	2205
gemiddelde B103 abiotisch	14240	8392	3200	2332
standaarddeviatie	27	3332	nb	277
B103 biotisch 1	14866	15	nb	1678
B103 biotisch 2	14852	<dl	nb	1662
B103 biotisch 3	15808	<dl	nb	1948
gemiddelde B103 biotisch	15175	5	3200	1763
standaarddeviatie	447	7	nb	131
B104 abiotisch 1	15145	12252	nb	2705
B104 abiotisch 2	15325	10027	nb	3034
B104 abiotisch 3	14956	10976	nb	4169
gemiddelde B104 abiotisch	15142	11085	4606	3303
standaarddeviatie	150	912	nb	627
B104 biotisch 1	17166	34	nb	2589
B104 biotisch 2	16570	<dl	nb	2947
B104 biotisch 3	16023	<dl	nb	3353
gemiddelde B104 biotisch	16586	11	4606	2963
standaarddeviatie	467	16	nb	312

* Wegens breken van flesje 2 werden de metingen na 10 weken op flesje 4 verricht

<dl: kleiner dan detectielimiet

nb: niet bepaald

Het aantal elektronen (in μmol) dat tijdens de afbraakttest door de aanwezige BTEX werd afgestaan en het aantal door biobeschikbaar Fe(III) opgenomen elektronen werd berekend en vergeleken in Tabel 6.14.

De afname van BTEX en Fe(III) zoals voorgesteld in tabel 6.14 is telkens berekend t.o.v. de T0-situatie (in de overeenkomstige testconditie) en niet t.o.v. de steriele controle bij de eindbepaling.

Tabel 6.14: Aantal uitgewisselde elektronen tussen BTEX en Fe(III) bij volledige oxidatie van de BTEX

	afname BTEX ($\mu\text{g/l}$)	afgestane e- (μmol)	afname FeIII (mg/kgds)	opgenomen e- (μmol)
B103 biotisch 1	14851	417	1522	818
B103 biotisch 2	14852	417	1538	826
B103 biotisch 3	15808	444	1252	672
B104 biotisch 1	17133	481	2017	1084
B104 biotisch 2	16570	465	1659	891
B104 biotisch 3	16023	450	1253	673

6.3.3 Conclusies

Vergelijking van de analytische methodes voor bepaling van ijzer(III)

Uit de resultaten in Tabel 6.10 blijkt dat de resultaten van de **0,5 M HCl-extractie**, gevolgd door ferrozinebepaling en IC-ICP-bepaling in de meeste gevallen vergelijkbaar zijn. Aangezien de Fe(III)-concentratie bij de ferrozinemethode indirect via het verschil $Fe_{\text{totaal}} - Fe(II)$ wordt bepaald, kunnen bij lage concentraties aan Fe(III) negatieve waarden bekomen worden. IC-ICP heeft als voordeel dat Fe(II) en Fe(III) rechtstreeks worden bepaald, waardoor het resultaat betrouwbaarder is en lagere gehalten aan Fe(III) kunnen gedetecteerd worden.

De **Shewanella-testkit** gaf in de meeste gevallen een Fe(III) gehalte dat 2 tot 3 keer lager lag dan de 0,5 M HCl-extractie. De bekomen gehalten zijn echter moeilijk te interpreteren, aangezien de gehalten aan totaal ijzer (Fe_{totaal}) aan het begin van de test (T0) en na incubatie van de Shewanellabacteriën (na 30 dagen: T30) in de helft van de gevallen onvoldoende (<80%) overeenstemmen. Dit is mogelijk te wijten aan heterogeniteit in de gebruikte bodemonsters. Bovendien waren de gebruikte testkits reeds 3 jaar oud (waarbij de vloeistof met bacteriën in de diepvriezer werden bewaard), wat mogelijk een effect heeft op de activiteit van de Shewanellabacteriën. Het globale beeld dat wordt bekomen met de Shewanella-testkit stemt echter overeen met de 0,5 M HCl extractie.

De **Ti(III)-EDTA-methode** geeft een overschatting van het biobeschikbaar Fe(III) in vergelijking met de twee voorgenoemde methoden. Deze methode gaf echter praktische problemen, aangezien de kleuromslag van de indicator in de helft van de gevallen niet eenduidig vast te stellen was in de extracten.

Relatie tussen afbraak en verbruik van ijzer(III)

De bepalingen die zijn uitgevoerd op aquiferstalen op vier plaatsen langsheen de centrale grondwaterstroombaan toonden aan dat het gehalte biobeschikbaar ijzer(III) in de bronzone (B102) duidelijk is verlaagd ten opzichte van dat in de niet verontreinigde stroomopwaartse zone (B101). Dit geeft aan dat biobeschikbaar ijzer(III) werd verbruikt voor afbraak van BTEX onder ijzerreducerende condities.

Zoals voor de eerste testsite, werd de 0,5 M HCl-extractie gebruikt om microbiële reductie van Fe(III) gedurende de BTEX-afbraaktest na te gaan.

In alle microcosms is het gehalte aan Fe(III) na incubatie afgenomen t.o.v. het oorspronkelijke gehalte aan Fe(III). Deze afname was groter in de levende microcosms, dan in de dode, wat aantoont dat ijzer(III) een functionele elektronacceptor (oxidans) voor de biologische afbraak is. Aangezien de concentratie aan mangaan eveneens sterk toenam in de microcosms (Tabel 6.9), wordt mangaan mogelijk ook gedeeltelijk gebruikt als elektronacceptor. Het grondwater bevatte ook veel sulfaat, maar dat werd niet gebruikt als elektronacceptor.

Uit de test blijkt dat de door het biobeschikbaar Fe(III) opgenomen hoeveelheid elektronen in de meeste microcosms ongeveer twee maal zo groot is dan de door petroleumkoolwaterstoffen afgestane hoeveelheid elektronen. Vermoedelijk wordt Fe(III) naast de anaerobe biodegradatie van BTEX eveneens door andere bodemprocessen als elektronacceptor gebruikt.

Deze vaststellingen bevestigen dat de methode met 0,5M HCl-extractie met ferrozinebepaling (of IC-ICP) het mogelijk maakt om afbraak met gebruik van

Fe(III) als elektronacceptor aan te tonen. De methode is ook nuttig voor het inschatten van de duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van BTEX.

Betekenis voor de sanering van de testlocatie

De resultaten van de bepalingen van de gehalten ijzer(III) in het veld en in de grondstalen van afbraaktesten geven aan dat er gunstige voorwaarden zijn voor verdere natuurlijke afbraak van BTEX in het veld. Enerzijds tonen de veldmetingen aan dat er in de bronzone een significant verbruik is opgetreden van ijzer(III), maar dat dit nog niet is uitgeput en dat de concentraties ijzer(III) in de verzadigde bodem van de pluimzone beduidend hoger zijn en verdere afbraak kunnen onderhouden. Anderzijds toonden de afbraaktesten aan dat er na het bekomen van volledige afbraak van BTEX (dat voorkwam in vergelijkbare concentraties als in het veld) nog voldoende biobeschikbaar ijzer(III) resteerde in de grond. In de praktijk dient men echter ook rekening te houden met de volledige vuilvracht die nog aanwezig is op het terrein. Aangezien er nog puur product aanwezig is in ongekende hoeveelheden is het moeilijk om een inschatting te maken van de totale behoefte aan elektronacceptoren zoals ijzer(III) en dit te vergelijken met de beschikbare voorraad aan elektronacceptoren.

Op basis van de resultaten van de labotesten merken we op dat natuurlijke attenuatie onder anaerobe condities niet in aanmerking komt voor de grondwaterverontreiniging met MTBE die op deze site is vastgesteld.

6.3.4 Monitoring van de situatie op de testsite

Uit de resultaten van de monitoring van de verontreiniging op site 2 (9 bemonsteringscampagnes tussen maart 2004 en mei 2006, 3-maandelijks) kan worden geconcludeerd dat de omvang van de verontreinigingspluim op 5-6 m-mv in de richting van de grondwaterstroming stabiel is. Peilbuizen P17 en P20 vertonen BTEX-concentraties beneden detectielimiet (in P20 wordt wel rond de 3 000 µg/l MTBE vastgesteld). Er blijkt echter continue aanvoer van verontreiniging te zijn vanuit de restverontreiniging aan P8 en P11 (nog steeds wordt puur product teruggevonden). De BTEX-concentraties in P14 namen aanvankelijk sterk toe in de tijd (beneden detectielimiet tot 88 000 µg/l BTEX in 18 maanden tijd), daalden vervolgens weer tot onder de 10 000 µg/l en fluctueren momenteel rond de 5 000 µg/l BTEX. In P16 verderop in de pluim is wel een significant dalende trend merkbaar (van 1.200 µg/l BTEX tot 12 µg/l). De MTBE-gehalten nemen in alle peilbuizen af, maar aangezien de stroomafwaartse P20 eveneens hoge MTBE-gehalten bevat, is dit mogelijk te wijten aan verdunning.

De verhoogde ijzergehalten in de het grondwater van P11, P14 en P16 (in vergelijking met de stroomopwaarts gelegen P17, tabel 6.1) wijzen er op dat Fe(II) in de verontreinigde zone sterker wordt vrijgezet in het grondwater en dat er daar dus afbraak van grondwaterverontreiniging onder ijzerreducerende condities is opgetreden. Dat is consistent met de resultaten van de afbraaktesten in het labo en met de waarneming dat de concentraties biobeschikbaar ijzer(III) in de grondstalen uit de bronzone lager zijn dan in de stroomopwaartse niet verontreinigde zone.

Uit deze observaties kan worden besloten dat in de pluimzone rond P16 anaerobe afbraak van BTEX optreedt, terwijl in de kernzone (P11) de aanwezigheid van puur product de biologische afbraak belemmert of maskeert. In P14 kan geen duidelijke uitspraak worden gedaan over het al dan niet optreden van biologische afbraak, aangezien er voortdurend nalevering optreedt vanuit de kernzone.

7 Conclusies

De duurzaamheid van natuurlijke attenuatie van BTEX wordt vooral bepaald door de hoeveelheid elektronacceptoren die beschikbaar zijn gedurende het proces. In anaerobe bodems bestaat de belangrijkste voorraad elektronacceptoren uit Fe(III). In dergelijke gevallen wordt de biobeschikbare fractie van Fe(III) verondersteld bepalend te zijn voor de duurzaamheid van MNA van petroleum koolwaterstoffen.

In het project werd vooral aandacht besteed aan methoden waarmee de voorraad aan biobeschikbaar Fe(III) kan worden begroot om duurzaamheid van MNA beter te kunnen voorspellen.

Dit werd getoetst aan de hand van afbraaktesten, waarbij de BTEX-afbraak gerelateerd werd aan de reductie van biobeschikbaar Fe(III).

7.1 Afbraaktesten BTEX

Het potentieel en de duurzaamheid van anaerobe afbraak van BTEX werd m.b.v. afbraaktesten nagegaan voor 2 testsites.

Voor beide testsites bleek dat praktisch alle BTEX anaeroob geoxideerd werden, terwijl MTBE niet afgebroken werd tijdens de looptijd van de test. Zelfs de concentratie aan benzeen, dat in vele gevallen als recalcitrant wordt aanzien, nam in beide microcosms af. (Bijna) volledige afbraak werd bereikt na respectievelijk 10 en 39 weken incubatie. Tijdens de afbraak fungeerde biobeschikbaar Fe(III) als de belangrijkste elektronacceptor.

De benzeenafbraak dient echter met omzichtigheid te worden geëvalueerd. Uit de literatuur blijkt dat benzeenafbraak sterk wordt geïnduceerd door minimale sporen zuurstof in het systeem. Hoewel de microcosms in anaerobe omstandigheden werden opgezet en bemonsterd, is het nooit helemaal uit te sluiten dat minimale hoeveelheden zuurstof in de microcosms hebben kunnen doordringen.

7.2 Biobeschikbaar Fe(III) als indicator voor duurzaamheid

7.2.1 Methodes voor de bepaling van biobeschikbaar Fe(III)

Drie methoden (0,5 M HCl extractie, Ti(III)EDTA-titratie en microcosms met *Shewanella alga* BrY) werden geselecteerd en vergeleken voor een selectie van bodemstalen afkomstig van de 2 testsites.

De ***Shewanella*-testkit** heeft als voordeel dat het een commercieel beschikbare, gestandaardiseerde microcosmtest is, gebaseerd op biologische activiteit. Een belangrijk nadeel is echter de vrij lange incubatietijd van 1 maand alvorens de resultaten beschikbaar zijn. De methode geeft slechts een indicatie (vaak een overschatting) van de sitespecifieke ijzerbeschikbaarheid, aangezien de resultaten gebaseerd zijn op de activiteit van *Shewanella alga* BrY en niet op de sitespecifieke ijzerreducerende bacteriën. Bovendien worden in de test "elektronshuttles" (AQDS) gebruikt om de Fe(III)-reductie te versnellen. Het is eveneens onduidelijk hoe lang de testkits houdbaar zijn zonder activiteitsverlies van de bacteriestam.

Het voordeel van de **0,5 M HCl extractie** is dat het een eenvoudige test is, die reeds na 48 u betrouwbare resultaten levert. De ferrozinebepaling is bovendien eenvoudig, stabiel en reproduceerbaar (zie Annex C). Uit de resultaten blijkt dat de concentraties aan biobeschikbaar Fe(III) bekomen met de 0,5 M HCl-extractie vergelijkbaar zijn met de gehalten die bepaald werden met de *Shewanella*-testkit.

Naast de evaluatie van de extractiemethode, werden eveneens 2 methodes voor de bepaling van de ijzerspeciatie in het extract vergeleken. Hieruit blijkt dat de ferrozinebepaling en IC-ICP-bepaling vergelijkbaar zijn voor de bepaling van de gehalten aan Fe^{2+} en $\text{Fe}_{\text{totaal}}$ in de extracten.

De *ferrozinemethode* is een eenvoudige techniek, gebaseerd op een kleurreactie en UV-Vis spectrofotografie. Aangezien de Fe(III)-concentratie bij de ferrozinemethode indirect via het verschil $\text{Fe}_{\text{totaal}} - \text{Fe(II)}$ wordt bepaald, kunnen bij lage concentraties aan Fe(III) echter negatieve waarden bekomen worden. Zoals voor de meeste colorimetrische bepalingen is het niet uitgesloten dat er interferenties kunnen optreden door andere stoffen dan ijzer(II). IC-ICP heeft als voordeel dat Fe(II) en Fe(III) rechtstreeks worden bepaald, waardoor het resultaat betrouwbaarder is en lagere gehalten aan Fe(III) kunnen gedetecteerd worden. Deze techniek vereist echter meer gespecialiseerde apparatuur.

De **Ti(III)-EDTA-methode** geeft steeds een grotere inschatting van het biobeschikbaar Fe(III) in vergelijking met de twee voorgenoemde methoden. Deze methode bepaalt immers het totaal oxiderend vermogen van het bodemstaal en niet enkel biobeschikbaar Fe(III). Deze methode geeft praktische problemen bij de uitvoering, aangezien de titratie onder N_2 -atmosfeer moet gebeuren en de kleuromslag van de indicator niet altijd eenduidig is vast te stellen.

7.2.2 Relatie tussen BTEX-afbraak en biobeschikbaar Fe(III)

Aangezien het een eenvoudige methode betreft, die vergelijkbare resultaten geeft met de *Shewanella*-testkit, werd voor beide testsites de 0,5 M HCl-extractie gebruikt om het verbruik van Fe(III) gedurende de BTEX-afbraaktest na te gaan.

De BTEX-afbraak was in beide gevalstudies vrij goed in overeenstemming met de waargenomen reductie in biobeschikbaar Fe(III). Dit wijst erop dat Fe(III) in beide gevallen optreedt als elektronacceptor voor de anaerobe afbraak van BTEX. Sulfaatreductie trad niet significant op in beide microcosmtesten. Mn(IV)-reductie lijkt eveneens verwaarloosbaar voor testsite 1, maar kan voor site 2 niet geheel uitgesloten worden.

De hoeveelheid biobeschikbaar Fe(III) kan bijgevolg gebruikt worden als maatstaf voor de beoordeling van de duurzaamheid van de natuurlijke attenuatie van BTEX.

7.2.3 Algemene conclusie

Uit een vergelijking van de verschillende methoden voor de bepaling van biobeschikbaar Fe(III) kan geconcludeerd worden dat de 0,5M HCl extractie, in combinatie met de ferrozinemethode of IC-ICP het best geschikt is. Naast een goede overeenstemming tussen de BTEX-afbraak en de met deze methode gemeten afname in biobeschikbaar Fe(III)-gehalten, heeft deze methode vooral als voordeel dat ze snel en eenvoudig is.

Om een prognose te maken van de duurzaamheid van natuurlijke afbraak van petroleumkoolwaterstoffen dient men de beschikbare voorraad terminale elektronacceptoren in de verontreinigde zone te vergelijken met de totale vuilvracht die verwijderd dient te worden. De elektronacceptoren dienen aantoonbaar relevant te zijn voor de aangetroffen verontreiniging. Op bepaalde locaties is het immers mogelijk dat bacteriën ontbreken die benzeen kunnen afbreken met bvb nitraat of sulfaat als elektronacceptor. In een aantal gevallen kan het zijn dat de beschikbare voorraad elektronacceptoren die men op eenvoudige wijze in het grondwater kan meten (zuurstof, nitraat en sulfaat) voldoende is om duurzame natuurlijke afbraak van de vuilvracht mogelijk te maken. Dan heeft een bepaling van biobeschikbaar ijzer(III) in grondstalen geen toegevoegde waarde. Bij de inschatting van de vuilvracht dient men rekening te houden met puur product indien dat aanwezig is.

8 Referenties

- Alvarez PJJ, Vogel TM, 1995. *Water Science and Technology* 31: 15-28. Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate-reducing conditions.
- Amor L, Kennes C and Veiga MC, 2001. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. *Bioresource Technology*, 78: 181-185.
- Anderson RT, Rooney-Varga JN, Gaw CV, Lovley DR, 1998. Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology* 32: 1222-1229.
- Anderson RT and Lovley DR, 2000. Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology* 34: 2261–2266.
- Anid Pj, Alvarez Pjj, Vogel Tm, 1993. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen-peroxide and nitrate. *Water Research* 27: 685-691.
- Baun A, Reitzel LA, Ledin A, Christensen TH, Bjerg PL, 2003. Natural attenuation of xenobiotic organic compounds in a landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *Journal Of Contaminant Hydrology* 65: 269-291.
- Beller HR, 2000. Metabolic indicators for detecting in situ anaerobic alkylbenzene degradation. *Biodegradation* 11: 125-139.
- Beller HR, Kane SR, Legler TC, Alvarez PJJ, 2002. A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environmental Science & Technology* 36: 3977-3984.
- Borden RC, Gomez CA, Becker MT, 1995. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. *Ground Water* 33: 180-189.
- Bradley PM, Aelion CM, Vroblesky DA, 1992. Influence of environmental-factors on denitrification in sediment contaminated with jp-4 jet fuel. *Ground Water* 30: 843-848.
- Burland SM, Edwards EA, 1999. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 529-533.
- Caldwell ME, Suflita JM, 2000. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions. *Environmental Science & Technology* 34: 1216-1220.
- Chakraborty R, Coates JD, 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 437-446.

- Chao, T. T., and L. Zhou 1983, Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am.*, 47: 225-232
- Coates JD, Chakraborty R, Lack JG, O'Connor SM, Cole KA, Bender KS and Achenbach LA, 2001. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* 411: 1039–1043.
- Coates JD, Chakraborty R, McInerney MJ, 2002. Anaerobic benzene biodegradation - a new era. *Research in Microbiology* 153: 621-628.
- Cunningham JA, Hopkins GD, Lebron CA, Reinhard M, 2000. Enhanced anaerobic bioremediation of groundwater contaminated by fuel hydrocarbons at Seal Beach, California. *Biodegradation* 11: 159-170.
- Cunningham JA, Rahme H, Hopkins GD, Lebron C, Reinhard M, 2001. Enhanced in situ bioremediation of BTEX contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environmental Science & Technology* 35: 1663-1670
- Da Silva MLB, Alvarez PJJ, 2002. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 128: 862-867.
- Elshahed MS, Gieg LM, McInerney MJ, Suflita JM, 2001. Signature metabolites attesting to the in situ attenuation of alkylbenzenes in anaerobic environments. *Environmental Science & Technology* 35: 682-689.
- ESTCP, 2002. Department of Defense USA, Field Demonstration and Validation of Novel Natural Attenuation Analytical Technologies.
- Franzmann PD, Robertson WJ, Zappia LR, Davis GB, 2002. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. *Biodegradation* 13: 65-78.
- Grbic-Galic D and Vogel TM, 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 254–260.
- Griebler C, Safinowski M, Vieth A, Richnow HH, Meckenstock RU, 2004. Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology* 38: 617-631.
- HACH Company, 1992. *Water Analysis Handbook* Loveland, CO.

- Hacherl EL, Kosson DS, Young LY, Cowan RM, 2001. Environmental Science & Technology, 35: 4886-4893. Measurement of Iron(III) Bioavailability in Pure Iron Oxide Minerals and Soils Using Anthraquinone-2,6-disulfonate Oxidation.
- Harwood CS and Gibson J, 1997. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? Journal of Bacteriology 179: 301–309.
- Heider J, Spormann AM, Beller HR and Widdel F, 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS Microbiology Reviews 22: 459–473.
- Heron G, Crouzet C, Bourg ACM, Christensen TH, 1994. Environmental Science & Technology, 28: 1698-1705. Speciation of Fe(II) and Fe(III) in contaminated aquifer sediments using chemical extraction techniques.
- Heron G, Christensen TH, Tjell JC, 1994. Environmental Science & Technology, 28: 153-158. Oxidation Capacity of Aquifer Sediments.
- Holliger C and Zehnder AJB, 1996. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology, 7: 326-330.
- Johnson SJ, Woolhouse KJ, Prommer H, Barry DA and Christofi N, 2003. Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. Engineering Geology, 70: 343-349.
- Kao CM, Borden RC, 1997. Site-specific variability in BTEX biodegradation under denitrifying conditions. Ground Water 35: 305-311.
- Kazumi J, Caldwell ME, Suflita JM, Lovley DR and Young LY, 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. Environmental Science and Technology 31: 813–818.
- Kennedy LG, Everett JW, Ware KJ, Parsons R, Green V, 1998. Bioremediation Journal 2 (3&4): 259-276. Iron and Sulfur Mineral Analysis Methods for Natural Attenuation Assessments, ,
- Kennedy L, Everett J, Gonzales J, xxx. Aqueous and Mineral Intrinsic Bioremediation Assessment Protocol.
- Langenhoff A, van Ras N, 2006. Anaerobe afbraak van benzeen, het ultieme bewijs. SKB-project PT04-120.
- Lin B, Van Verseveld HW, Roling WFM, 2002. Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation. Biomedical And Environmental Sciences 15: 130-144.
- Lovley DR., Phillips EJP, 1987. Appl. Environ. Microbiol., 53(7): 1536-1540. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments.

- Lovley DR, 1997. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18: 75-81.
- Lovley DR, 2000. Anaerobic benzene degradation. *Biodegradation* 11: 107–116.
- Martus P and Püttmann W, 2003. Formation of alkylated aromatic acids in groundwater by anaerobic degradation of alkylbenzenes. *The Science of The Total Environment*, 307: 19-33.
- Meckenstock RU, Warthmann RI, Schafer W, 2004. Inhibition of anaerobic microbial o-xylene degradation by toluene in sulfidogenic sediment columns and pure cultures. *Fems Microbiology Ecology* 47: 381-386.
- Morasch B, Annweiler E, Warthmann RJ and Meckenstock RU, 2001. The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: degradation of naphthalene, o-, and m-xylene by sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 183-191.
- Nales M, Butler BJ and Edwards EA, 1998. Anaerobic benzene degradation: a microcosm survey. *Bioremediation Journal* 2: 125–144.
- Namocatcat JA, Fang J, Barcelona MJ, Quibuyen ATO, Abrajano TA, 2003. Trimethylbenzoic acids as metabolite signatures in the biogeochemical evolution of an aquifer contaminated with jet fuel hydrocarbons. *Journal of Contaminant Hydrology* 67: 177-194.
- New Horizons Diagnostics Inc., <http://www.nhdiag.com/fe.shtml> (06/11/2002)
- OVAM, 2005. In-situ Bioremediatie van petroleumkoolwaterstoffen – Code van Goede praktijk. D/2005/5024/15.
- Phelps CD, Young LY, 1999. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* 10: 15-25.
- Phillips EJ and Lovley DR, 1987. *Soil Sci. Soc. Am.*, 51: 938-941. Determination of Fe(III) and Fe(II) in oxalate extracts of sediment.
- Pijls CGJM, Keijzer ThJS, Marnette ECL, Sumann M, Volkering F, van Zutphen M, 2006. In-situ bodemsanering, theorie en praktijk. Tauw bv, Deventer.
- Rabus R, Wilkes H, Schramm A, Harms G, Behrends A, Amann R and Widdel F, 1999. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the -subclass of Proteobacteria. *Environmental Microbiology* 1: 145–157.

- Reinhard M, Shang S, Kitanidis PK, Orwin E, Hopkins GD, Lebron CA, 1997. In situ BTEX biotransformation under enhanced nitrate- and sulfate-reducing conditions. *Environmental Science & Technology* 31: 28-36.
- Reusser DE, Istok JD, Beller HR, Field JA, 2002. In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology* 36: 4127-4134.
- Richnow HH, Meckenstock RU, Reitzel LA, Baun A, Ledin A and Christensen TH, 2003. In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *Journal of Contaminant Hydrology*, 64: 59-72.
- Ruiz-Aguilar GML, Fernandez-Sanchez JM, Kane SR, Kim D, Alvarez PJJ, 2002. Effect of ethanol and methyl-tert-butyl ether on monoaromatic hydrocarbon biodegradation: Response variability for different aquifer materials under various electron-accepting conditions. *Environmental Toxicology And Chemistry* 21: 2631-2639.
- Schmitt R, Langguth HR, Puttmann W, Rohns HP, Eckert P, Schubert J, 1996. Biodegradation of aromatic hydrocarbons under anoxic conditions in a shallow sand and gravel aquifer of the Lower Rhine Valley, Germany. *Organic Geochemistry* 25: 41-50.
- Schnell S, Ratering S, Jansen KH, 1998. *Environmental Science & Technology* 32: 1530-1537. Simultaneous Determination of Iron(III), Iron(II), and Manganese(II) in Environmental Samples by Ion Chromatography.
- Schreiber ME, Bahr JM, 2002. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. *Journal Of Contaminant Hydrology* 55: 29-56.
- Starr R C, Ingleton R A, 1992. *Groundwater Monitoring Review*, 12: 91-95.
- Tiehm A, Schulze S, 2003. Intrinsic aromatic hydrocarbon biodegradation for groundwater remediation. *Oil & Gas Science and Technology- Revue de l'Institut Francais du Petrole* 58: 449-462.
- Van Ras NJP, Winters RO, Lieten SH, Dijkhuis JE, Henssen MJC, van Hattem WA, Lethbridge G, 2007. Sustainability of natural attenuation of aromatics (BTEX). Final report. NICOLE, Port of Rotterdam, Shell Global Solutions, Bioclear b.v.
- Vanbeelen P, Vanvlaardingen P, 1994. Toxic effects of pollutants on the mineralization of 4-chlorophenol and benzoate in methanogenic river sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 1051-1060

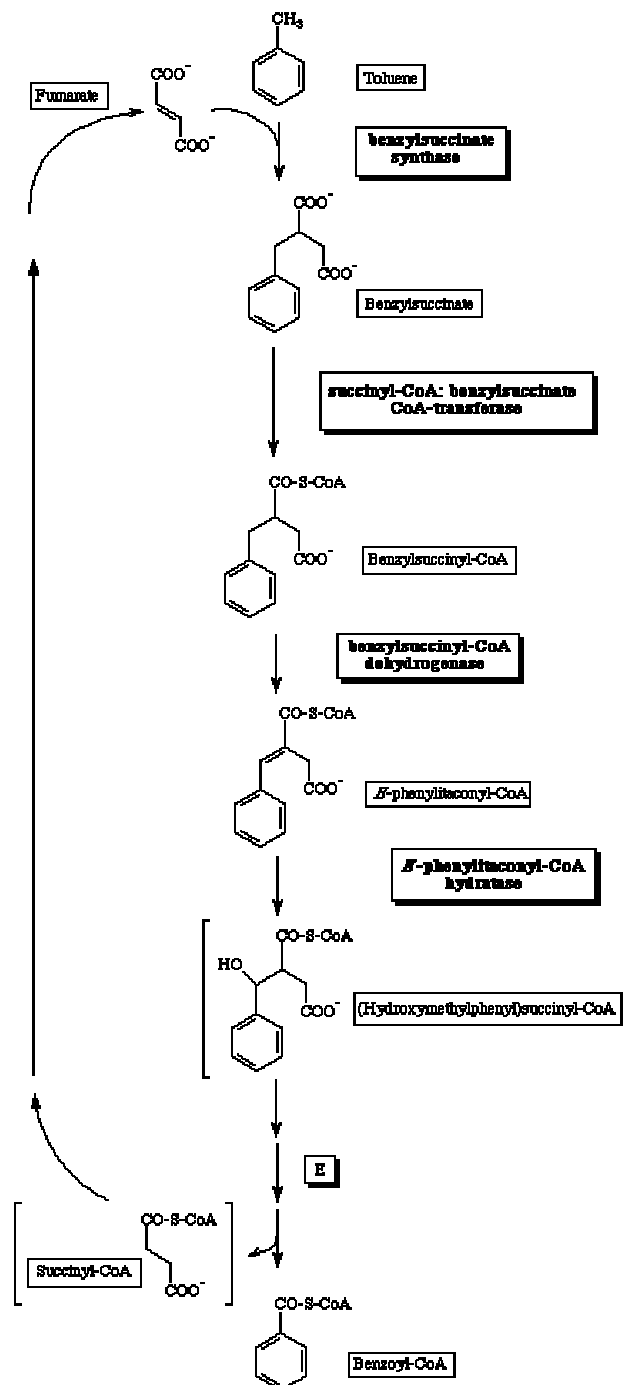
- Villatoro-Monzon WR, Mesta-Howard AM, Razo-Flores E, 2003. Anaerobic biodegradation of BTEX using Mn(IV) and Fe(III) as alternative electron acceptors. *Water Science and Technology* 48: 125-131.
- Wiedemeier TH, Swanson MA, Wilson JT, Kampbell DH, Miller RN, Hansen JE, 1996. Approximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. *Ground Water Monitoring and Remediation*
- Weiner JM and Lovley DR, 1998. Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidising enrichment. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 775–778.
- Yerushalmi L, Lascourreges JF, Guiot SR, 2002. Kinetics of benzene biotransformation under microaerophilic and oxygen-limited conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 79: 347-355.

BIJLAGEN

Bijlage A: Afbraakroutes BTEX

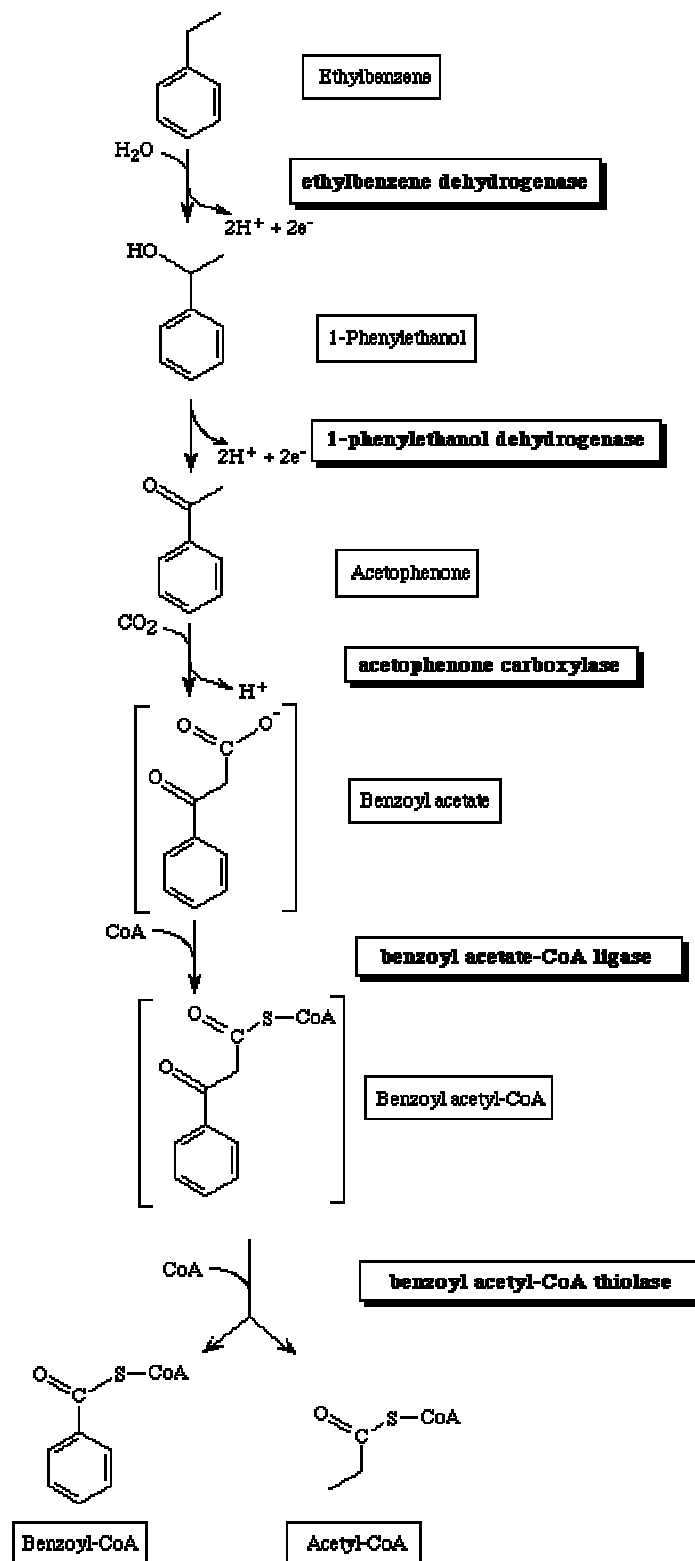
Appendix - The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (<http://umbbd.ahc.umn.edu/>) - reactiemechanismen

Anaerobe toluenemineralisatie onder denitrificerende omstandigheden is reeds aangetoond voor pure bacteriële culturen. Naast benzoaat zijn benzylsuccinaat en *E*-fenylitaconaat geïdentificeerde intermediairen. De oxidatie van benzylsuccinaat tot *E*-fenylitaconaat is afhankelijk van CoA (succinyl-CoA), hetgeen suggereert dat de werkelijke intermediairen benzylsuccinyl-CoA en fenylitaconyl-CoA zijn. De afbraakroutes worden in onderstaande schema's getoond; stoffen die tussen haakjes staan zijn niet geïdentificeerd maar gepostuleerd. Organismen die de metabolisatieroute kunnen initiëren worden gegeven, maar andere bacteriën kunnen mogelijk de daaropvolgende stappen uitvoeren.

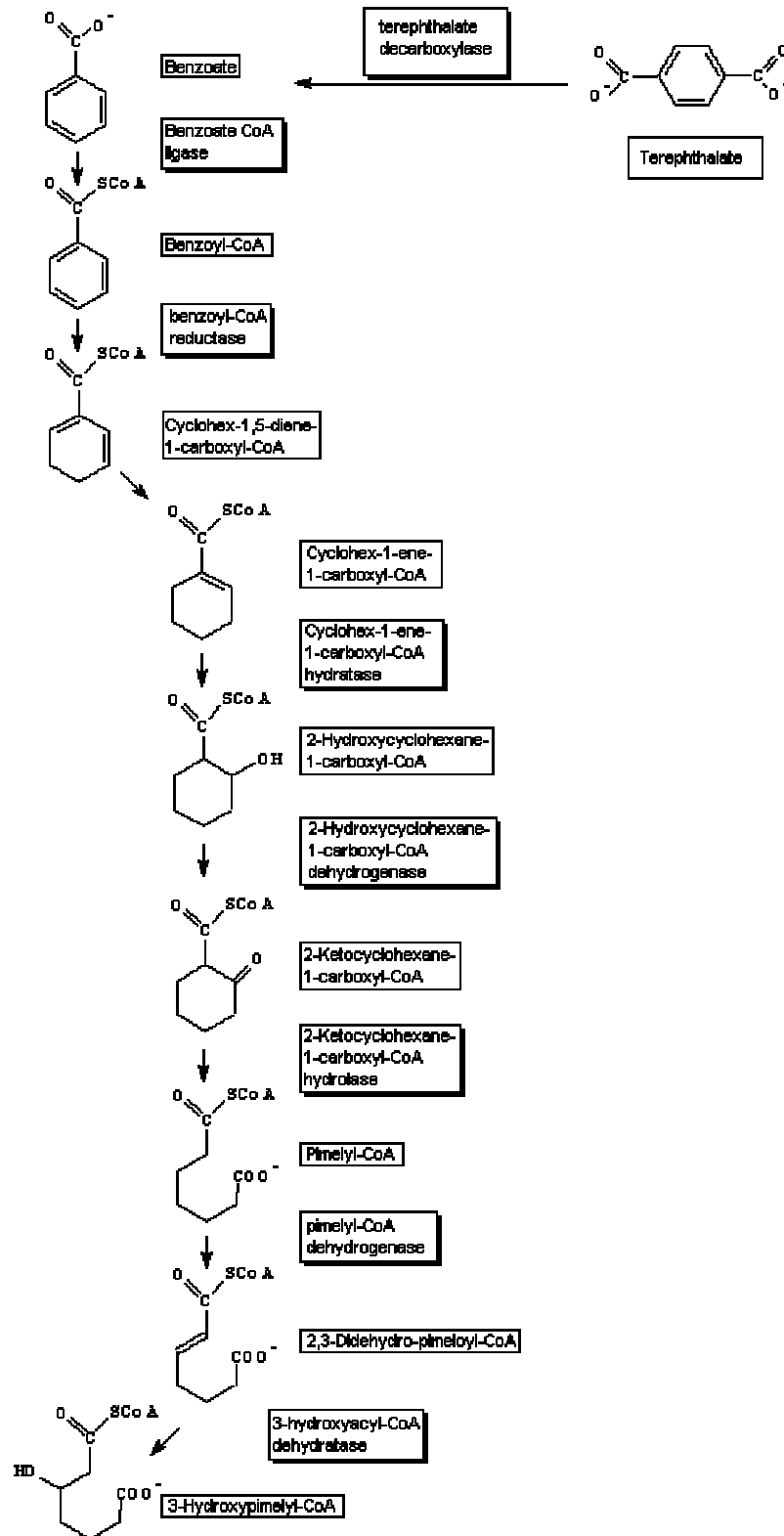


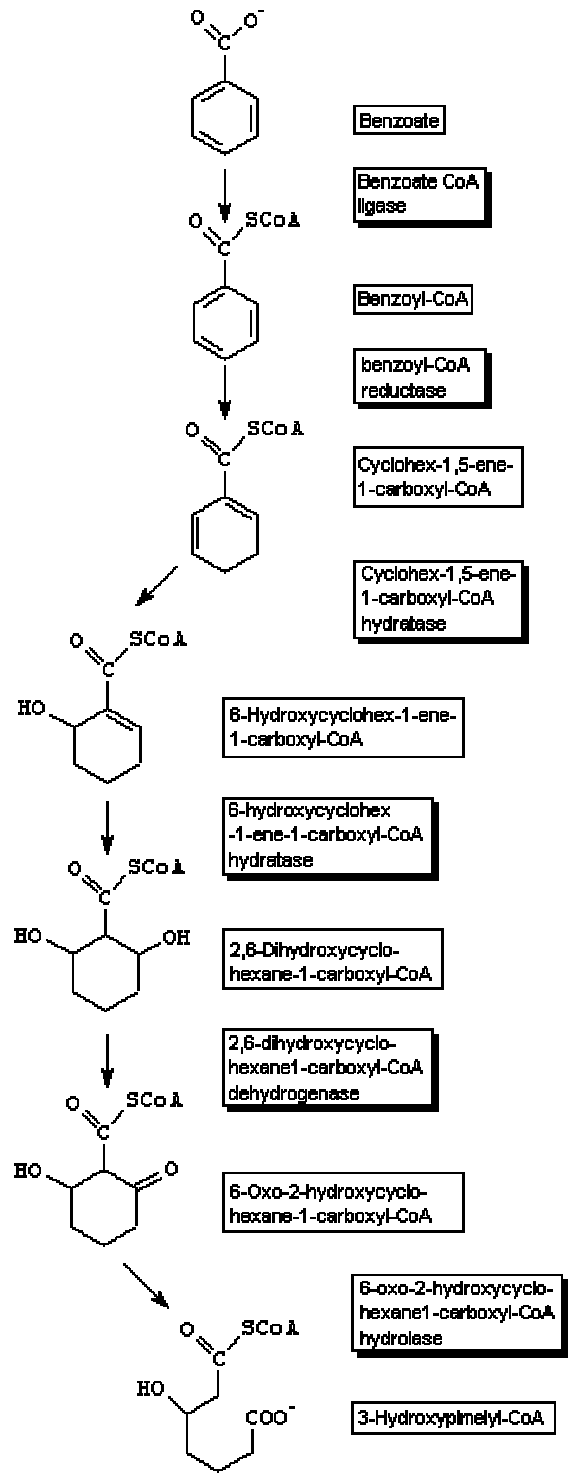
Alfred Spormann and Eva Young

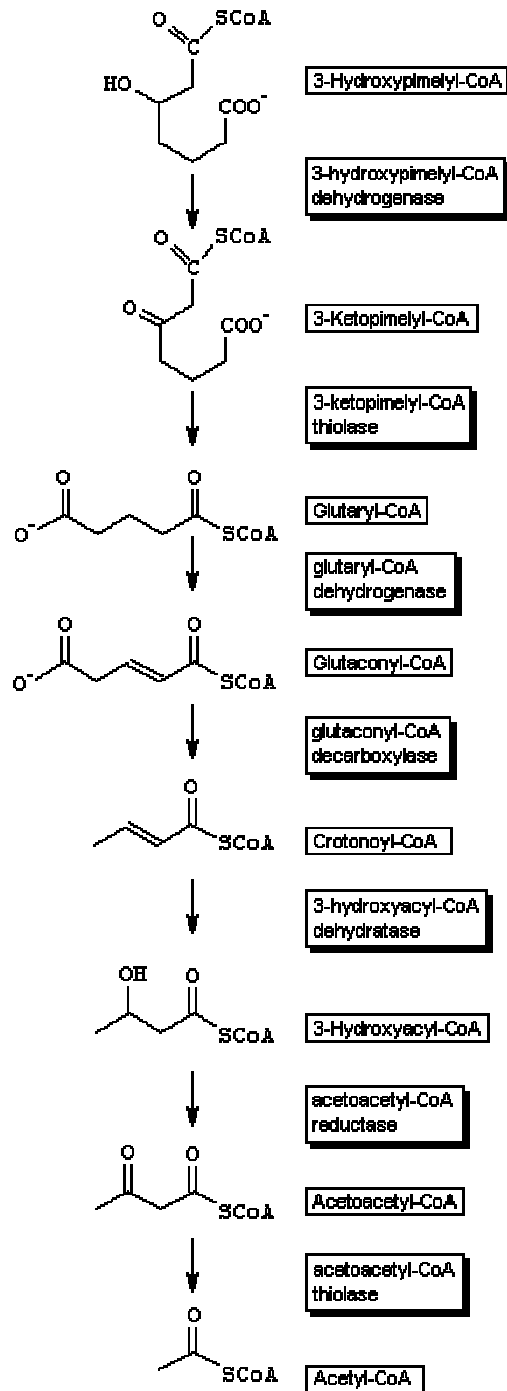
Ethylbenzeenmineralisatie werd ook aangetoond voor pure denitrificerende bacteriële culturen. De eerste stap is hier een dehydrogenatie tot 1-fenyl ethanol dat vervolgens wordt omgezet tot benzoaat (of benzoyl-CoA). De vermoedelijke afbraakroute is hieronder weergegeven.



De de-aromatisering van de benzeenring gebeurt door een 2-elektron reductie van benzoyl-CoA tot cyclohexadiene-1-carboxyl-CoA. Dit wordt daaropvolgend geoxideerd tot 3-hydroxypimelyl-CoA; hiervoor zijn twee metabolische routes gekend. De meeste studies van anaerobe benzoaat-degradatie zijn uitgevoerd met de fototrofische bacterie *Rhodopseudomonas palustris* en met twee denitrificeerders: *Azoarcus evansii* (vroeger gekend als *Pseudomonas* sp. Stam K 172 en KB 740, respectievelijk).







Bijlage B: Protocols voor bepaling biobeschikbaar Fe(III)

MILDZURE EXTRACTIE MET 0,5 M HCL VOLGENS HET IMBEMA-PROTOCOL

Extractiemethode 0,5 M HCl

De extractie gebeurt op identieke wijze zoals beschreven in paragraaf 3.3.1.

Werkwijze:

1. Neem een 25 ml serumflesje;
2. Spoel het flesje 3x met HCl (6N). Alle glaswerk dat voor deze bepaling gebruikt wordt dient op dezelfde wijze gespoeld en gedroogd te worden;
3. Droog het flesje in een droogstoof bij 105°C;
4. Vul het flesje met 0,6-0,8 gds sediment in de anaerobe kast;
5. Neem een ander substraat voor droge stof bepaling;
6. Voeg 15 ml ontgast HCl (0,5 N) toe;
7. Sluit het flesje af met een crimpcap en haal het uit de anaerobe kast;
8. Plaats het flesje gedurende 48 uur op een roterende schudtafel;
9. Centrifugeer of filtreer (0,45 µm) het extract;
10. Bewaar het filtraat onder N₂-atmosfeer.

Ijzerbepaling in de extracten via de ferrozinemethode

Voor de bepaling van de ijzerspeciatie in de extracten wordt uitgegaan van HACH-methodes 8146 en 8147. De HACH-methodes zijn evenwel methodes bedoeld voor de meting van Fe²⁺ en Fe_{totaal} in waterige oplossingen. Omwille van deze reden zijn een aantal modificaties doorgevoerd waardoor de methodes ook bruikbaar worden voor de bepaling van Fe²⁺ en Fe_{totaal} in extracten.

A. Bepaling van Fe²⁺

A.1. Bereiding standaardoplossingen

De geconcentreerde stockoplossing (100 mg Fe²⁺/l) wordt verkregen door 0,1745 g (NH₄)₂Fe(II)(SO₄)₂·6H₂O op te lossen in 250 ml ontgast demi-water. Vanuit deze stockoplossing worden 2 verdunde standaardoplossingen bereid, waarvan de Fe²⁺-concentraties respectievelijk gelijk zijn aan 0,5 mg/l en 0,05 mg/l.

De inhoud van een zakje HACH-poeder (HACH company, ferrous iron reagent powder pillow, referentie 1037-69) wordt overgebracht in een 20 ml vial. Vervolgens wordt 15 ml standaardoplossing toegevoegd. Indien na 3 minuten incubatie de pH kleiner is dan 8 dan wordt de oplossing verder gebufferd door extra toediening van NaHCO₃. De Fe²⁺-concentratie in de standaardoplossing wordt op dezelfde manier gemeten als in de extracten.

A.2. Bepaling Fe^{2+} in extracten

1. Doe een zakje HACH-poeder in een vial van 25 ml en voeg 25 ml gedestilleerd water toe;
2. Breng vervolgens 50 μl filtraat van het extract in dit flesje. Er treedt een verkleuring op;
3. De oplossing licht opschudden en bufferen tot pH 8 met NaHCO_3 (met plastic spatel, als poeder). Minstens 3 minuten laten reageren. De oplossing binnen de 2 uur analyseren;
4. Maak een blanco staal door evenveel (als in 2.) extractvloeistof (0,5 M HCl) in een 25 ml vial te brengen met HACH-poeder en gedestilleerd water;
5. Meetcuvetten spoelen met de te meten oplossing (voorzie 1 meetcuvet voor de blanco en 1 meetcuvet voor de gekleurde oplossing);
6. Beide oplossingen (staal en blanco) overbrengen in meetcuvet;
7. Blanco direct meten (zero instellen op fotospectrometer) + staal meten. De meting wordt uitgevoerd op een golflengte $\lambda = 510 \text{ nm}$;
8. Indien $C < 0,05 \text{ mg/l}$ of $> 0,5 \text{ mg/l}$ maak dan een nieuwe oplossing aan (zoals in 1.) maar doseer respectievelijk meer of minder filtraat;

De pH-elektrode wordt tussen de verschillende metingen gespoeld met gedestilleerd water en gedroogd.

B. Bepaling van $\text{Fe}_{\text{totaal}}$

B.1. Bereiding standaardoplossingen

De geconcentreerde stockoplossing (100 mg Fe/l) werd aangekocht bij HACH (HACH-company, Iron Standard Solution, 100 mg/l Fe, referentie 14175-42). De concentraties Fe in de verdunde standaardoplossingen zijn respectievelijk gelijk aan 1,0 mg/l en 0,1 mg/l.

Een 15 ml vial wordt gevuld met de inhoud van een ampule ferrozine-oplossing (FerroZine Iron Reagent Solution Pillows, HACH-company, referentie 2301-66). Vervolgens wordt 15 ml standaard oplossing toegevoegd. Oplossing 5 minuten laten reageren en binnen de twee uur analyseren.

B.2. Bepaling $\text{Fe}_{\text{totaal}}$ in extracten

1. Vul 25 ml-vial met 25 ml gedestilleerd water;
2. Voeg 25 μl filtraat van het extract toe (toegevoegde hoeveelheid is de helft van toegevoegd filtraat bij Fe^{2+} -bepaling);
3. De pH van deze oplossing moet gelegen zijn tussen 3 en 5. Verhoog eventueel de pH van de oplossing door NH_4OH (10% in gedestilleerd water) toe te voegen;
4. Voeg één ampule HACH-reagens (ferrozine) toe (vermijd contact tussen schaar en oplossing!)
5. Licht opschudden en minimaal 5 minuten laten reageren. De analyse dient maximaal 2 uur nadien uitgevoerd te worden;

6. Indien $C < 0,1 \text{ mg/l}$ of $> 1,0 \text{ mg/l}$ maak dan een nieuwe oplossing (zoals in 1.), maar doseer respectievelijk meer of minder filtraat;
7. Maak een blanco staal door evenveel (als in 2.) extractvloeistof (0,5 M HCl) in een 25 ml vial te brengen en een ferrozine-ampule en gedestilleerd water toe te voegen;
8. Spoel meetcuvetten met de te meten oplossing (voorzie 1 meetcuvet voor de blanco en 1 meetcuvet voor de gekleurde oplossing);
9. Breng beide oplossingen (staal en blanco) in meetcuvet;
10. Meet de blanco direct (zero instellen) en vervolgens het staal;

De pH-elektrode wordt tussen de verschillende metingen gespoeld met gedestilleerd water en gedroogd.

C. Concentratie Fe(III)

De Fe(III)-concentratie wordt berekend als het verschil tussen de gemeten concentraties $\text{Fe}_{\text{totaal}}$ en Fe^{2+} .

Ijzerbepaling m.b.v. ionenchromatografie(IC-ICP-MS)

In een tweede fase werd voor site 2 eveneens een ijzerspeciatiebepaling uitgevoerd via ionenchromatografie. De gebruikte kolom is van Dionex met IonPac CS5A(4x250mm) als scheidingskolom en CG5A(4x50mm) als guardkolom. ICP-MS fungeert als detector met volgende specificaties:

- eluens: 7 mM PDCA, 66mM KOH, 5,6 mM K₂SO₄ en 74mM formic acid (mierenzuur)
- pompsnelheid: 1.2 ml/min
- verstuiving in ICP-MS gebeurt via een MCN (microconcentrische nebuliser) op een cyclonic chamber (cyclonische verstuivingskamer) van 50ml. Power ICP-MS 1100 watt; Nebuliser 0.9ml/min

BEPALING VAN DE OXIDATIECAPACITEIT MET Ti^{3+} -EDTA

De bepaling gebeurt volgens de methode zoals beschreven in Heron *et al.* (1994).

Alle glaswerk wordt eerst gespoeld met warm HCl 1/1, nagespoeld met demi-water en gedroogd in een droogstoof bij 105°C. Vloeistoffen en oplossingen die bij deze bepaling gebruikt worden, worden anaeroob gemaakt.

A. Reactieoplossingen

Volgende oplossingen worden aangemaakt:

- 1 N NaOH;
- 15 % (m/m) HCl;
- *neutraal-rood-indicator*: 0,1 g neutraalrood wordt in 100 ml ethanol/demi-water (50% (V/V)) opgelost (kleuromslag rood - amber bij pH = 6,8-8,0 en amber - purper bij redoxtitratie);
- 0,2 mM $K_2Cr_2O_7$: aan 30,7 mg $K_2Cr_2O_7$ wordt 50 ml geconcentreerd H_2SO_4 toegevoegd; deze oplossing wordt met demi-water aangelengd tot 500 ml;
- EDTA-oplossing 0,083 M: 15,53 g EDTA wordt aangelengd met demi-water tot 0,5 l;
- Ti^{3+} -stockoplossing: 1,5 g $TiCl_3$ met laag ijzergehalte wordt in 15 % HCl opgelost en aangelengd tot 10 ml met 15 % HCl;
- 0,026 M $TiCl_3$: 1,34 ml Ti^{3+} -stockoplossing wordt met 15 % HCl aangelengd tot 50 ml.
- Ti^{3+} -EDTA-oplossing: 4,65 g EDTA wordt opgelost in 220 ml demi-water en op pH 6 gebracht met 1 N NaOH. Vervolgens wordt 2 ml Ti^{3+} -stockoplossing toegevoegd (hierbij zakt pH tot $\pm 3,7$). De pH van de oplossing wordt opnieuw op 6 gebracht met toevoeging van 1 N NaOH. De oplossing wordt aangelengd met demi-water tot 250 ml. De concentratie Ti^{3+} in de extractieoplossing bedraagt 8,0 mM.

B. Extractie

1. in de anaerobe kast wordt 1 g grond in een serumflesje van 20 ml gebracht;
2. aan het flesje wordt 10 ml Ti^{3+} -EDTA-oplossing toegevoegd en het flesje wordt vervolgens met een septum afgesloten;
3. het flesje wordt in het donker op een schudtafel geplaatst zodanig dat het aquifermateriaal in suspensie blijft;

- na 24 uur wordt het flesje gecentrifugeerd om deeltjes groter dan 0,25 μm te verwijderen.

C. Redoxtitratie

De redoxtitraties worden in de anaerobe kast uitgevoerd.

Eerst wordt een kalibratiecurve opgesteld op basis van vijf standaardoplossingen met concentraties variërend van 0,40 tot 8,00 mM Ti^{3+} . De ijkoplossingen worden aangemaakt met 30 ml EDTA-oplossing op pH 6. Aan deze oplossing wordt een gekende hoeveelheid 0,026 M TiCl_3 -oplossing (volgens tabel) toegevoegd. De toevoeging gebeurt in stappen van 2 ml. Na elke toevoeging wordt de pH van de oplossing terug op 6 gebracht met 1 N NaOH. Alle standaardoplossingen worden met demi-water aangelengd tot 50 ml. De concentratie EDTA in de ijkoplossingen is gelijk aan 0,05M.

Tabel 1: Toegevoegde hoeveelheid TiCl_3 -oplossing bij aanmaak standaardoplossingen

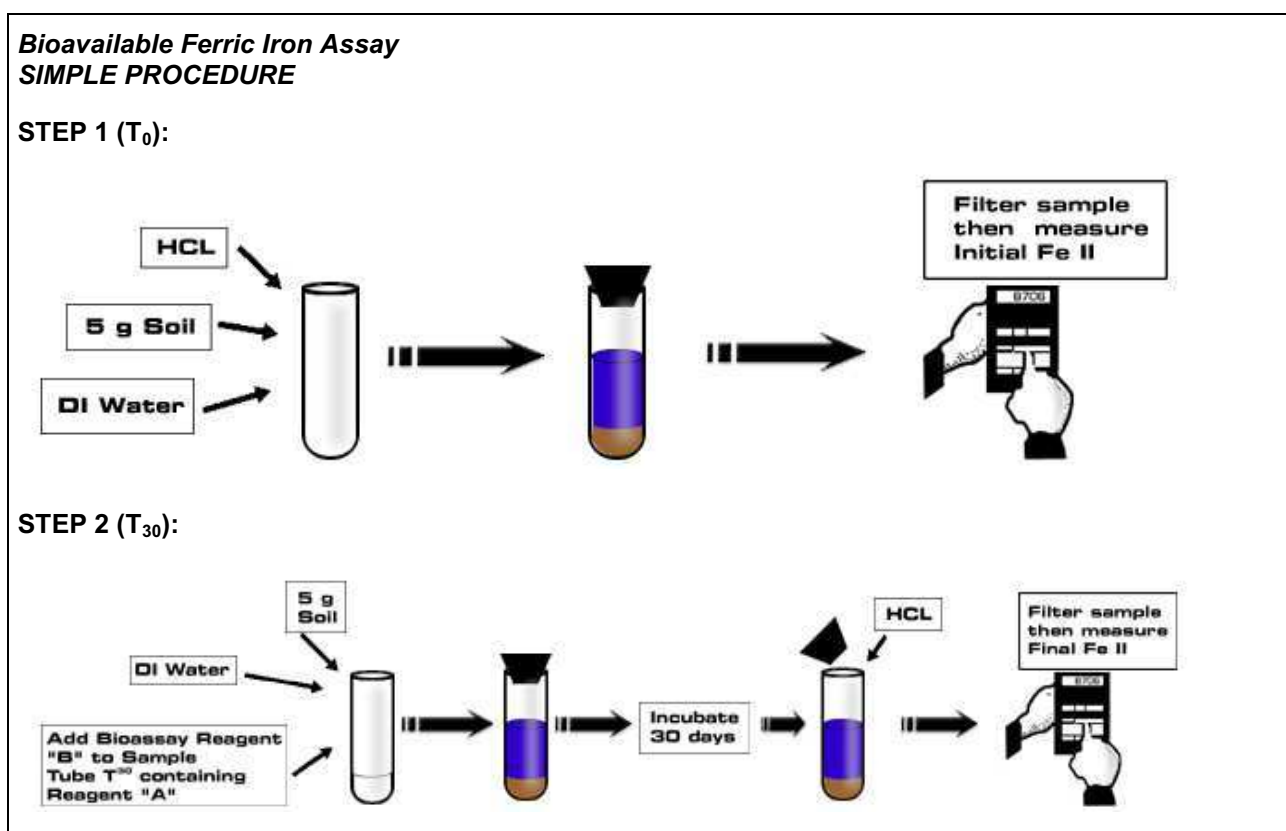
Ijkoplossing	Toegevoegde 0,026 M TiCl_3 -opl (ml)	Concentratie Ti^{3+} (mM)
1	0,8	0,40
2	2,0	1,00
3	4,0	2,00
4	8,0	4,00
5	16,0	8,00

Van elke standaardoplossing wordt 4 ml in een erlenmeyer gebracht. Hieraan wordt 50 μL neutraal-rood-indicator toegevoegd. Deze oplossing wordt getitreerd met 0,2 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Op het einde van de titratie slaat de kleur om van kleurloos-amber naar donkerviolet. Alle redoxtitraties worden in drievoud uitgevoerd.

Van elk extract wordt 4 ml in een erlenmeyer gebracht en getitreerd met 0,2 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Tijdens de titratie slaat de kleur van het filtraat om van purper naar lichtblauw. Op het moment van de kleuromslag wordt 50 μl neutraal-rood toegevoegd en wordt verder getitreerd tot een nieuwe kleuromslag plaatsvindt van kleurloos-amber naar donkerviolet.

MICROCOSMTEST MET DE SHEWANELLA ALGA BY (NEW HORIZONS DIAGNOSTICS)

De testprocedure uit paragraaf 3.3.5 is volledig gevolgd. De bepaling van het Fe^{2+} -gehalte gebeurt conform de procedure beschreven voorgaande paragrafen. Voor site 1 werd gebruik gemaakt van HACH-methode 8146 op basis van ferrozine, terwijl de meting voor site 2 gebeurde via IC-ICP-MS.



Figuur 1: Werkwijze 'Bioavailable ferric iron assay' (New Horizons Diagnostics)

Bijlage C: Stabiliteit en reproduceerbaarheid bepalingmethoden biobeschikbaar Fe(III)

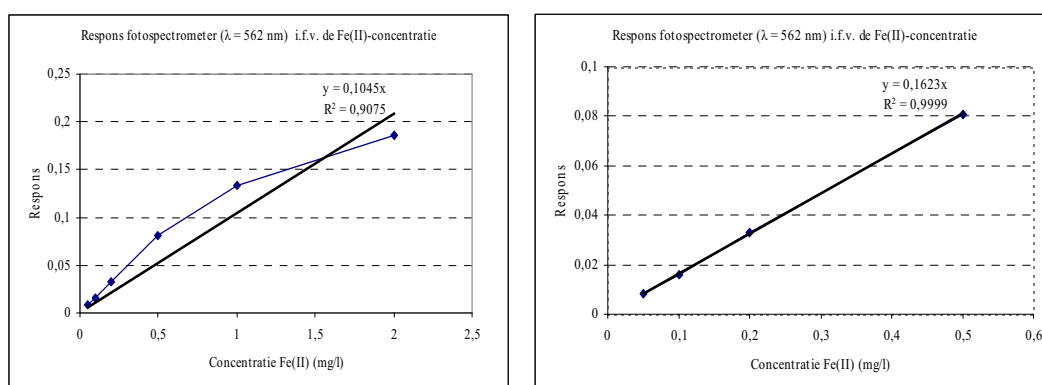
Op basis van de analyseresultaten van de stalen van site 1 te Mechelen werd een beknopte studie uitgevoerd naar de stabiliteit en de reproduceerbaarheid van de methoden om biobeschikbaar Fe(III) te bepalen.

ZACHTE EXTRACTIE MET 0,5 M HCL VOLGENS HET IMBEMA-PROTOCOL

De controle van stabiliteit en reproduceerbaarheid beperkt zich tot de fotospectrometrische bepaling van Fe^{2+} ($\lambda = 510 \text{ nm}$) en $\text{Fe}_{\text{totaal}}$ ($\lambda = 562 \text{ nm}$). De extractiemethode wordt niet onderzocht, alsdusdanig. In hoofdstukken 5.3.2 en 6.3.2 van dit rapport wordt een vergelijking gemaakt tussen de Fe(III)-gehalten verkregen als resultaat van de drie bestudeerde extractiemethoden.

A. Fotospectrometrische bepaling van Fe^{2+}

A.1 Lineariteit



Op $\lambda = 562 \text{ nm}$ werd de respons van 6 verschillende standaardoplossingen – met concentraties gaande van 0,05 tot 2,0 mg/l – gemeten. Uit bovenstaande grafieken blijkt dat in het meetbereik van 0,05 tot 0,5 mg/l de fotospectrometer perfect lineair is.

A.II. Reproduceerbaarheid

Drie standaardoplossingen van 1,0 mg/l werd onafhankelijk van elkaar bereid, vertrekkende van éénzelfde geconcentreerde Fe^{2+} -oplossing (100 mg/l).

De relatieve standaarddeviatie van de gemeten respons is gelijk aan 1,2%.

A.III. Stabiliteit Fe^{2+} -derivaat

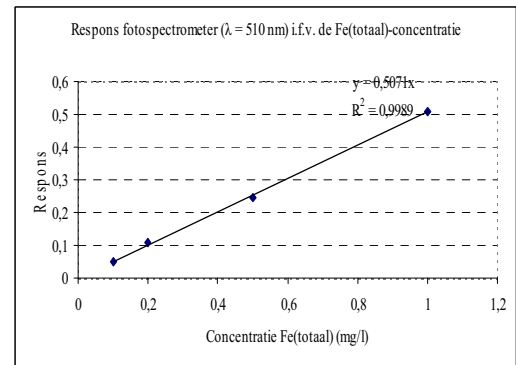
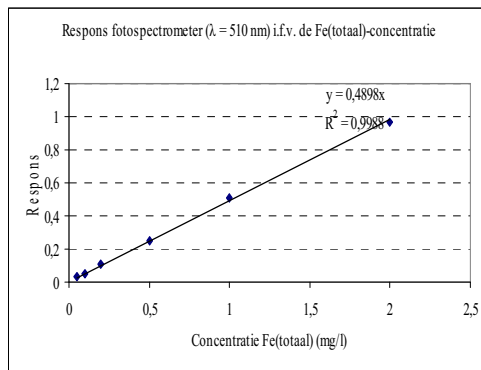
Uit onderstaande tabel blijkt dat éénmaal het HACH-reagens toegevoegd is, de respons i.f.v. de tijd constant blijft. Dit betekent dat het Fe^{2+} -derivaat stabiel is.

Tabel 2: Stabiliteit Fe^{2+} -derivaat ($C_{Fe(II)} = 1,0 \text{ mg/l}$)

	t = 0	t = 15'	t = 30'	t = 60'	t = 140'
Respons	0,134	0,133	0,133	0,133	0,134

B. Fotospectrometrische bepaling van Fe_{totaal}

B.I. Lineariteit



Op $\lambda = 510 \text{ nm}$ werd de respons van 6 verschillende standaardoplossingen – met concentraties gaande van 0,05 tot 2,0 mg/l – gemeten. Uit bovenstaande grafieken is er niet direct een verschil m.b.t. lineariteit waarneembaar.

In tabel 3 zijn de concentraties van de standaardoplossingen berekend, een eerste maal op basis van een éénpuntskalibratie met de standaard 2,0 mg/l en een tweede maal op basis van een éénpuntskalibratie met de standaard 1,0 mg/l. Hieruit blijkt duidelijk dat de minst geconcentreerde standaard buiten het lineariteitsbereik van de fotospectrometer valt. De meest geconcentreerde standaard wordt ook best weggelaten. Binnen het meetbereik van 0,1 tot 1,0 mg/l is er een vrij goede lineariteit.

Tabel 3: Berekening concentraties standaardoplossingen op basis van 1-puntskalibratie met standaardoplossing 2 mg/l en 1 mg/l

Concentratie (mg/l)	Extinctie	1-puntskalibratie met stand. 2 mg/l		1-puntskalibratie met stand. 1 mg/l	
		Berekende concentratie (mg/l)	Afwijking (%)	berekende concentratie (mg/l)	Afwijking (%)
0,05	0,036	0,074	49	0,071	41
0,1	0,052	0,107	7	0,102	2
0,2	0,110	0,227	14	0,216	8
0,5	0,246	0,508	2	0,483	-3
1,0	0,509	1,05	5	1,0	0
2,0	0,968	2,0	0		

B.II. Reproduceerbaarheid

Drie standaardoplossingen van 1,0 mg/l werd onafhankelijk van elkaar bereid, vertrekkende van éénzelfde geconcentreerde Fe_{totaal} -oplossing (100 mg/l).

De relatieve standaarddeviatie van de gemeten respons is gelijk aan 0,6%.

B.III. Stabiliteit Fe^{\cdot} derivaat

Uit onderstaande tabel blijkt dat éénmaal het HACH-reagens toegevoegd is, de respons i.f.v. de tijd constant blijft. Dit betekent dat het bekomen ijzerderivaat stabiel is.

Tabel 4: Stabiliteit Fe -derivaat ($C_{Fe(\text{totaal})} = 1,0 \text{ mg/l}$)

	T = 0	t = 15 '	T = 30 '	t = 60 '	t = 140 '
Respons	0,495	0,497	0,495	0,497	0,497

BEPALING MET Ti^{3+} -EDTA

A. Kalibratiecurve

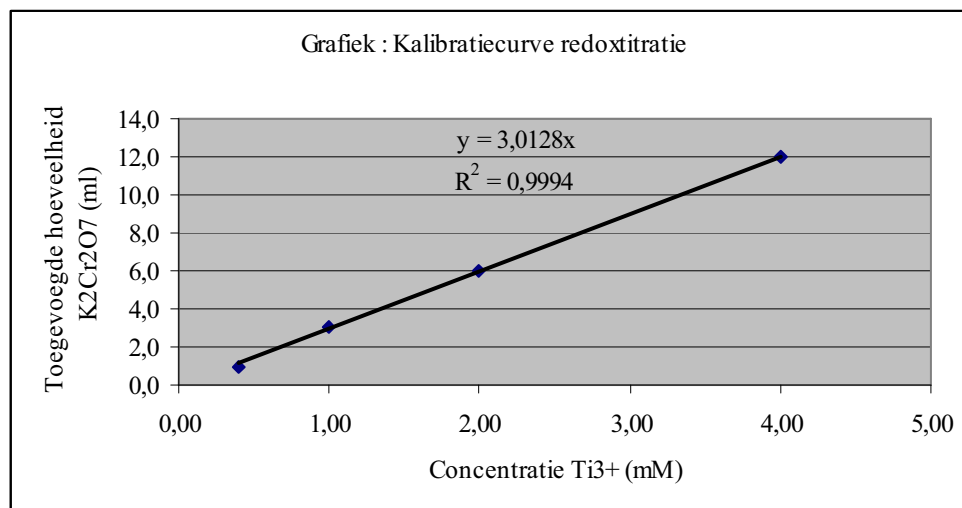
Tabel 5: Toegevoegde hoeveelheden $K_2Cr_2O_7$ bij redoxtitratie

IJKoplossing	Concentratie Ti^{3+} (mM)	Toegevoegde hoeveelheid $K_2Cr_2O_7$ (ml)		
		1 ^e titratie	2 ^e titratie	3 ^e titratie
1	0,40	0,95	1,1	1,0
2	1,00	2,9	3,0	3,05
3	2,00	5,75	6,1	6,05
4	4,00	11,5	11,55	12,05

Opmerkingen:

- na toevoeging van de indicator kan de te titreren oplossing rood gekleurd zijn. De rode kleur verdwijnt meteen na toevoeging van $K_2Cr_2O_7$.
- bij de 1^e (=snelle) titratie werd de neutraal-rood-indicator direct toegevoegd;
- bij de 2^e titratie werd de neutraal-rood-indicator pas in de helft van de titratie toegevoegd;
- bij de 3^e titratie werd de neutraal-rood-indicator pas in de helft van de titratie toegevoegd; de laatste ml's $K_2Cr_2O_7$ werden druppelsgewijs met een tussenpauze van 10 à 15 seconden toegevoegd;

De kalibratiecurve is berekend met de toegevoegde hoeveelheden $K_2Cr_2O_7$ (ml) in de 3^e titratie. De berekende ijklijn is geforceerd door 0.



B. Staalanalyse

Titratie van de extracten gebeurt op dezelfde manier als de titratie van de standaardoplossingen. De restconcentratie Ti^{3+} in het filtraat wordt berekend a.h.v. de toegevoegde hoeveelheid $K_2Cr_2O_7$. De verbruikte hoeveelheid Ti^{3+} is gelijk aan het verschil tussen de initieel aanwezige hoeveelheid (8 mM) en de verbruikte hoeveelheid. Bij de berekening van het Fe(III)-gehalte wordt uitgegaan van de hypothese dat de oxidatiecapaciteit van Fe(III) gelijk is aan de totale oxidatiecapaciteit van het aquifer.

Tabel 6: Bepaling Fe(III)-concentraties in aquifermateriaal Site 1 Mechelen

Staal	toegevoegde hoeveelheid $K_2Cr_2O_7$ (ml)		Concentratie Fe(III) (mg/kgds)		
	run 1	run 2	run 1	run 2	gemiddelde
Site 1 TPB 2,5-2,75m	0,2	2,8	4637	4132	4385
Site 1 TPB 3,5-4m	5,6	5,8	4704	4653	4678
Site 1 TPB 4,5-5m	0,2	3,0	5652	4990	5321
Site 1 TPB 2 2,5-3m	4,2	4,5	4791	4719	4755
Site 1 TPB 2 3,5-4m	9,8	10,0	3470	3421	3445
Site 1 TPB 2 4,5-5m	9,5	9,85	3202	3125	3164