

Anaërobe afbraak van benzeen, het ultieme bewijs (PT04-120)

Auteurs Alette Langenhoff
 Niels van Ras

Datum juli 2006

Inhoudsopgave	2
1. Informatieblad	4
2. Inleiding	6
3. Aantonen anaërobe afbraak op de locaties	7
4. Beschrijving van de werkzaamheden	9
4.1 Inleiding	9
4.2 Specifieke afbraaktesten	10
4.3 Specifieke intermediaire analyses	11
4.4 Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	12
4.5 Specifieke moleculaire analyses	12
5. Vries-4	14
5.1 Uitgevoerde werkzaamheden Vries-4	14
5.2 Resultaten Vries 4	16
5.2.1 Grondwaterkarakterisatie	16
5.2.2 Afbraaktesten	17
5.2.3 Intermediaire analyses	19
5.2.4 Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	19
5.2.5 Moleculaire analyses	20
5.2.6 Samenvatting Vries-4	21
6. Roswinkel	23
6.1 Uitgevoerde werkzaamheden Roswinkel	23
6.2 Resultaten Roswinkel	25
6.2.1 Grondwaterkarakterisatie	25
6.2.2 Afbraaktesten	26
6.2.3 Intermediaire analyses	26
6.2.4 Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	27
6.2.5 Moleculaire analyses	27
6.2.6 Samenvatting Roswinkel	28
7. Johannes Postkazerne	30
7.1 Uitgevoerde werkzaamheden Johannes Postkazerne	30
7.2 Resultaten Johannes Postkazerne	32
7.2.1 Grondwaterkarakterisatie	32
7.2.2 Afbraaktesten	33
7.2.3 Intermediaire analyses	33
7.2.4 Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	34
7.2.5 Moleculaire analyses	34
7.2.6 Samenvatting Johannes Postkazerne	33

8. Conclusies over de bruikbaarheid van de verschillende analysetechnieken	36
8.1 Afbraaktesten	36
8.2 Intermediaire analyses	36
8.3 Verbindings specifieke stabiele isotopen analyses	37
8.4 Moleculaire analyses	38
8.5 Eindconclusie	39

Bijlagen

1 Informatieblad

Project

SKB-Projectnummer	PT04-120
Titel	Anaërobe afbraak van benzeen, het ultieme bewijs
Verkorte titel	--
Thema	Praktijkprojecten Technologie
Projectkosten	€ 40.000,-

Consortium

Penvoerder:

Bedrijf	Contactpersoon	Telefoonnummer	e-mail adres
TNO-MEP	Alette Langenhoff	055 - 5493034	alette.langenhoff@tno.nl

Overige leden:

Bedrijf	Contactpersoon	Telefoonnummer	e-mail adres
Bioclear	Niels van Ras	050 - 5718455	vanras@bioclear.nl
NAM	Geert Nijburg	0592 - 362174	geert.nijburg@shell.com
DGW&T Noord	Rob Hakstege	038 - 4572410	cr.hakstege@mindef.nl

Samenvatting van het project

Doelstelling en probleemstelling

Wereldwijd wordt een belangrijke groep verontreinigingen in de bodem gevormd door BTEX (benzeen, toluen, ethylbenzeen en xyleen). Ook in Nederland vormen deze stoffen op circa 35 % van alle verontreinigde locaties een probleem. Benzeen is de stof die daarbij bepalend is: van de BTEX-verbindingen is het de meest mobiele en toxische, en de meest langzaam afbreekbare component onder anaërobe condities.

Er is een grote behoefte aan de bewijsvoering dat anaërobe benzeenafbraak op een bepaalde locatie optreedt.

Deze bewijsvoering dient als ondersteuning voor het optreden van natuurlijke afbraak (NA) of om aan te tonen dat gestimuleerde afbraak van benzeen met bijvoorbeeld nitraat of sulfaat op een locatie een effectieve methode is.

Activiteiten

In dit project staat de bewijsvoering van de anaërobe afbraak van benzeen centraal. Naast traditionele methodes om afbraak aan te tonen (meting van verontreinigingen in de tijd en modellering) zijn 4 recent ontwikkelde, alternatieve methodes toegepast, die een aanvulling vormen op de meer traditionele methode:

- Geconditioneerde afbraaktesten;
- Specifieke intermediair metingen;
- Verbindings specifieke stabiele isotopen analyses;
- Moleculaire technieken (voor anaërobe BTEX afbraak in beginfase).

Projectresultaten

Resultaat van dit project is de waarde van de combinatie van monitoringstechnieken en de beschrijving *welke methoden wanneer* ingezet kunnen worden om de anaërobe afbraak van benzeen aan te tonen.

Projectconclusie

Uit het project volgt dat de afbraaktesten geschikt zijn om afbraakpotentieel vast te stellen. Ook de stabiele isotopen analyses zijn hiervoor geschikt, maar voor deze analyses zijn er meerdere randvoorwaarden waaraan moet worden voldaan, namelijk monsters in de stroombaan of in de tijd. De intermediair metingen op (alkyl)fenolen, benzoaten en benzylsuccinaat geven een algemeen inzicht in het optreden van anaërobe afbraak van BTEX, maar zijn minder geschikt om specifiek anaërobe benzeenafbraak vast te stellen. De resultaten wijzen erop dat uit benzeen fenol wordt gevormd, maar dit is onvoldoende onderbouwd om deze metingen als bewijs te kunnen gebruiken. Daarnaast lijken deze intermediären niet onder alle anaërobe redoxcondities op te hopen tot meetbare concentraties en kunnen (alkyl)fenolen ook als oorspronkelijke verontreiniging aanwezig zijn.

Ten slotte zijn de moleculaire analyses nog niet ver genoeg ontwikkeld om anaërobe benzeenafbraak vast te stellen. De samenstelling van de microbiële populatie is per locatie verschillend en er zijn ook verschillen aangetoond tussen referentie, bron en pluim op de afzonderlijke locaties. Uit de identificatie van dominante soorten blijkt dat micro-organismen aanwezig zijn die aromatische verbindingen kunnen afbreken. Een specifiek indicator-organisme voor anaërobe benzeenafbraak is echter niet gevonden.

Trefwoorden

Gecontroleerde trefwoorden	Vrije trefwoorden
Benzeen	Intermediären
Anaëroob	Specifieke analysetechnieken
Afbreekbaarheid	
Stabiele isotopen	

2 Inleiding

Wereldwijd wordt een belangrijke groep verontreinigingen in de bodem gevormd door BTEX (benzeen, toluen, ethylbenzeen en xyleen). Ook in Nederland vormen deze stoffen op circa 35 % van alle verontreinigde locaties een probleem. Benzeen is de stof die daarbij de risico's van de verontreiniging bepaald: van de BTEX-verbindingen is benzeen de meest mobiele en toxische, en de meest langzaam afbreekbare component onder anaërobe condities.

Op meerdere locaties in Nederland wordt gemonitord naar de afbraak van BTEX, waarbij de aandacht vooral op de afbraak van benzeen is gericht. De locaties liggen verspreid over Nederland en betreffen locaties waar zowel natuurlijke afbraak (NA) als gestimuleerde afbraak wordt toegepast. Bij de monitoring wordt voornamelijk geanalyseerd op de verontreiniging zelf, de aromaten. Daarnaast worden vaak ook de redoxcondities en de veranderingen daarin gevolgd.

Voor dit project is een aantal van deze locaties geselecteerd. Deze locaties zijn weergegeven in tabel 2.1.

Tabel 2.1 Overzicht van de locaties

	Locatie	Beschrijving
1	Vries-4	locatie van de NAM, één van de proeflocaties van SKB-project SV-604 waarin het effect van sulfaatdosering op de anaërobe afbraak van BTEX is vastgesteld
2*	Roswinkel*	locatie van de NAM
3	Johannes Postkazerne	Locatie van de koninklijke Landmacht, BTEX verontreiniging in hoge concentraties, één van de proeflocaties van SKB-project SV-604 waarin het effect van sulfaatdosering op de anaërobe afbraak van BTEX is vastgesteld

*) Was in het oorspronkelijke plan Zuiderpolder, zie hoofdstuk 6

Op de locaties Vries-4 en Johannes Postkazerne is de anaërobe afbraak van benzeen gestimuleerd door het toevoegen van sulfaat. Het effect van sulfaatdosering en het verloop van de afbraak is onder andere gevolgd door het meten van de benzeenconcentratie en de redoxcondities. Op de locatie Roswinkel vinden nog geen saneringactiviteiten plaats; de aanwezige verontreiniging wordt regelmatig gemonitord door analyses op BTEX.

3 Aantonen anaërobe afbraak benzeen op locaties

Er is een grote behoefte aan de bewijsvoering dat anaërobe benzeenafbraak op een bepaalde locatie optreedt. Deze bewijsvoering dient als ondersteuning voor het optreden van natuurlijke afbraak (NA) of om aan te tonen dat gestimuleerde afbraak van benzeen met bijvoorbeeld nitraat of sulfaat op een locatie een effectieve methode is.

Op meerdere locaties in Nederland (zie o.a. hoofdstuk 2) wordt monitoring verricht naar de afbraak van BTEX, waarbij vooral benzeen een belangrijke rol speelt. Bij de monitoring wordt voornamelijk geanalyseerd op de verontreiniging zelf, de aromaten en de redoxcondities.

Aanvullende monitoringstechnieken die verdere bewijsvoering kunnen leveren worden vanwege de onbekendheid hiermee niet of nauwelijks uitgevoerd. Dit ondanks het feit dat aanvullende analyses het vertrouwen in een mogelijke aanpak (NA of gestimuleerde biologische afbraak) kunnen vergroten. Daarmee kan het gebruik van kosteneffectieve saneringstechnieken voor benzeen- en BTEX-verontreinigingen toenemen.

Deze relatief nieuwe monitoringstechnieken worden op de in hoofdstuk 2 genoemde locaties met een benzeen- of BTEX verontreiniging toegepast. Naast veel gebruikte methodes om afbraak aan te tonen (veldkarakterisatie, meting van verontreinigingen in de tijd en evt. modellering), zullen 4 ontwikkelde, alternatieve methodes worden toegepast, die een aanvulling vormen op deze veelal gebruikte methodes:

- Geconditioneerde afbraaktesten;
- Specifieke intermediair metingen;
- Verbindings specifieke stabiele isotopen analyses;
- Moleculaire technieken (in beginfase).

Afbraaktesten worden vaak omwille van kosten niet uitgevoerd, terwijl deze een toegevoegde waarde hadden voor de locaties waar dit wel is uitgevoerd. Hiermee is bijvoorbeeld het verloop van benzeenafbraak met nitraat of sulfaat als elektronenacceptor aangetoond of dat NA van benzeen (en andere aromaten) op een locatie mogelijk was. Nadelen van deze afbraaktesten zijn de kosten en de tijdsduur van anaërobe afbraaktesten (enkele maanden). Vaak past, de benodigde tijd wel binnen de planvormingsfase en staat de benodigde tijd in verhouding tot de saneringsduur van de verontreiniging (enkele jaren tot tientallen jaren).

Het aantreffen van specifieke intermediairen die ontstaan bij de afbraak van aromaten, waaronder benzeen, kan ook worden gebruikt bij de interpretatie van afbraakmogelijkheden en optredende omzettingsprocessen.

Verbindings specifieke stabiele isotopen analyses zijn al in enkele projecten toegepast. Gebleken is dat verschuivingen in isotopenverhoudingen inderdaad kunnen worden gebruikt om de afbraak van een verbinding – ook bij lage afbraaksnelheid – aan te tonen. Onbekendheid met deze methodiek maakt dat er tot nu toe relatief weinig gebruik van wordt gemaakt.

Verder is er de laatste jaren een duidelijke progressie geboekt op het gebied van moleculaire detectietechnieken, waarbij op genetisch niveau specifieke bacteriën of bacteriegroepen kunnen worden gedetecteerd in bijvoorbeeld bodem- of grondwatermonsters. Te denken valt bijvoorbeeld aan het analyseren van perchloorethyleen-afbrekende organismen. Bij de omzetting van perchloorethyleen zijn een aantal specifieke organismen betrokken, zoals *Dehalococcoides ethenogenes*. Door specifiek naar deze bacteriën te kijken, is het mogelijk om een uitspraak te doen over de aan- of afwezigheid van perchloorethyleen-afbrekende organismen. Indien wordt gefocust op specifieke groepen bacteriën of enzymen die betrokken zijn bij de aromaten en/of benzeenafbraak, dan kan dit een toegevoegde waarde hebben bij de interpretatie van de afbraakpotentie voor benzeen. Voor benzeen is dit echter nog niet mogelijk, omdat de betrokken bacteriën of enzymen nog niet bekend zijn. Daarom zijn deze moleculaire methoden voor het aantonen van benzeenafbraak nog in ontwikkeling en zijn daarom slechts een klein onderdeel van dit project.

4 Beschrijving van de werkzaamheden

4.1 Inleiding

Normaal gesproken worden als basis “The three lines of evidence” van de US EPA gebruikt om de natuurlijke of gestimuleerde biologische afbraak vast te stellen. Dit zijn:

1. Het meten van de verdwijning van de uitgangsstof (de verontreiniging);
2. Het meten van tussen en/of eindproducten (ontstaan bij afbraak);
3. Het aantonen van (actieve) microbiële populaties.

Deze standaardmethoden hebben echter ook nadelen en de bewijsvoering van bijvoorbeeld benzeenafbraak met alleen deze methoden is lastig.

Vanzelfsprekend is het van belang om de afname van de verontreiniging (punt 1) te meten. De verdwijning van de uitgangsstof met behulp van concentratiemetingen is echter veelal niet eenduidig te relateren aan biologische afbraak omdat in de bodem ook tal van andere processen (zoals adsorptie, verdunning, vervluchtiging) van belang zijn. Bovendien dienen voor het kwantificeren van afbraaksnelheden in het veld de concentraties van verontreinigingen over een periode van vaak vele jaren gevolgd te worden.

Het meten van intermediären (punt 2) blijkt voor de afbraak van benzeen moeilijk te zijn. Dit bijvoorbeeld in tegenstelling tot de anaërobe omzetting van perchlooretheen, waarbij goed meetbare intermediären zoals trichlooretheen, dichlooretheen, vinylchloride en etheen sequentieel worden gevormd. Redenen voor complicatie bij de bewijsvoering van benzeenafbraak zijn dat:

- nog niet onomstotelijk is aangetoond wat mogelijke tussenproducten zijn bij de anaërobe afbraak van benzeen;
- tussenproducten vaak slechts in zeer lage, moeilijk detecteerbare, concentraties gevormd worden;
- de ontstane intermediären afkomstig kunnen zijn van andere verbindingen dan benzeen, bijvoorbeeld het ontstaan van benzoaat bij de aërobe en anaërobe afbraak van zowel toluen als xyleen. Dit is met name lastig wanneer verontreinigingen in mengsels voorkomen (wat op de meeste locaties het geval is);
- sommige afbraakproducten ook als oorspronkelijke verontreiniging aanwezig kunnen zijn;
- afbraakproducten ook gevormd kunnen worden uit natuurlijke verbindingen, bijvoorbeeld de productie van vetzuren en CO₂ bij afbraak van natuurlijk organisch materiaal zoals veen.

Het aantonen van (actieve) microbiële populaties (punt 3) is controversieel. Vaak worden hierbij analyses uitgevoerd op “algemene” microbiële populaties. Dit terwijl in elke – niet steriele – bodem bacteriën aanwezig zullen zijn. Vaak zullen bij dit soort analyses de aangetoonde populaties niet per definitie specifiek een rol spelen bij de omzetting van de verontreinigingen (zoals benzeen) omdat ze in de bodem bijvoorbeeld natuurlijke substraten in plaats van de verontreinigingen gebruiken. Het aantonen van deze populaties zegt dan ook niets over de daadwerkelijke afbraakcapaciteit voor bijvoorbeeld een benzeenverontreiniging. Voor het aantonen van de omzetting van chloorethenen worden sinds een aantal jaren wel moleculaire technieken gebruikt. De betrokken bacteriën en enzymen zijn bekend, waardoor deze technieken gebruikt kunnen worden om (actieve) populaties aan te tonen.

In dit project gebruiken wij vier technieken, die de hierboven genoemde methodes aanvullen om daarmee te bewijzen dat de anaërobe afbraak van benzeen in het veld optreedt.

Deze technieken betreffen:

- A. Specifieke afbraaktesten;
- B. Specifieke intermediaire analyses;
- C. Verbindings specifieke stabiele isotopen analyses;
- D. Specifieke moleculaire analyses.

Bij deze technieken kan worden gesteld dat afbraaktesten en isotopen analyses reeds vaker zijn uitgevoerd en aangemerkt kunnen worden als ontwikkelde methoden. De specifieke intermediaire analyses worden minder toegepast en deze zullen nog bewezen moeten worden in het veld. Dit geldt zeker ook voor de specifieke moleculaire analyses. Deze techniek bevindt zich in het ontwikkelingsstadium. Dit betekent dus dat in dit project gebruik wordt gemaakt van een mix van grotendeels uitontwikkelde technieken en nieuwe technieken in ontwikkeling.

Op de geselecteerde locaties worden de vaste monitoringsparameters zoals verontreiniging en redoxcondities gemeten en veranderingen daarin vastgesteld. Aanvullend op deze analyses en monitoring is een combinatie van genoemde technieken toegepast om de bewijsvoering van met name de benzeenafbraak te versterken.

Voor de interpretatie van de aanvullende resultaten is het van groot belang om de resultaten van standaard analyses (verontreiniging, redoxcondities, omgevings- en procescondities) te kunnen gebruiken. Deze gegevens worden in de lopende projecten op kosten van de opdrachtgever verzameld en zijn gebruikt om een totale interpretatie te kunnen geven.

4.2 Specifieke afbraaktesten

Afbraaktesten, uitgevoerd onder natuurlijke of gestimuleerde condities, kunnen goed worden ingezet om de afbraakpotentie in een grond- of grondwatermonster van een locatie te bepalen. Deze benadering werkt alleen indien voldoende aandacht is gegeven aan het correct uitvoeren van de test. Dit betekent dat de natuurlijke condities gehandhaafd moeten blijven en dat gestimuleerde condities nauwkeurig worden ingesteld. Op deze manier is een goed beeld te krijgen van de afbraakcapaciteit in een bodem van bijvoorbeeld benzeen onder natuurlijke of gestimuleerde condities.

Omdat de werkwijzes van TNO en Bioclear iets anders zijn, worden beide methodes beschreven.

Werkwijze batches TNO

De batches zijn in duplo uitgevoerd met anaërobe grond en grondwater van de locatie. De batchexperimenten zijn uitgevoerd in 250 ml serumflesjes. Deze zijn in een anaërobe handschoenenkast gevuld met 20 gram grond op de locatie en 100 ml grondwater uit de betreffende peilbuis en afgesloten met een viton stop en aluminium cap. Door toevoeging van extra N₂ staan de flesjes onder een lichte overdruk, zodat inlekkers van lucht wordt voorkomen en anaërobe condities zijn gewaarborgd.

De steriele batches zijn vervolgens geautoclaveerd gedurende 20 minuten en na afkoelen is een steriele oplossing kwikchloride toegevoegd (eindconcentratie 50 mg/l). Na een dag

acclimatiseren bij de juiste temperatuur is een hoeveelheid anaërobe oplossing benzeen toegevoegd, indien nodig (eindconcentratie 1 mg/l).

De flesjes zijn vervolgens schuddend geïncubeerd bij 20°C. Op verschillende tijden zijn vloeistofmonsters genomen en geanalyseerd op benzeen en sulfaat, afhankelijk van het verloop van de afbraakprocessen. De tijdsduur van de batchexperimenten is afhankelijk van de snelheid van de biologische processen.

De concentratie benzeen is bepaald na bemonstering van de waterfase (1 ml) met een glazen 1 ml spuit. Aan dit monster is HgCl₂ (eindconcentratie 50 mg/l) toegevoegd om de biologische activiteit in dit monster te remmen en vervolgens geanalyseerd met Solid Phase Micro Extraction (SPME) injectie en GC-FID analyse. Een vergelijkbaar vloeibaar monster is gebruikt voor de bepaling van de nitraat- en sulfaatconcentratie met behulp van een Dionex analyse.

Werkwijze batches Bioclear

De batchexperimenten zijn in triplo uitgevoerd met anaërobe grond en grondwater van de locatie. De batchexperimenten zijn uitgevoerd in 250 ml serumflesjes, die onder stikstofatmosfeer gevuld zijn met 150 gram gehomogeniseerde grond (natgewicht) en 150 ml grondwater uit de betreffende peilbuis. De batches zijn afgesloten met een stop met viton inlayer en aluminium cap.

De abiotische batches zijn gesteriliseerd door toevoeging van een steriele oplossing van natriumazide en kwikchloride toegevoegd (eindconcentraties van respectievelijk 250 en 500 mg/l). Omdat uit de startanalyses bleek dat er van nature te weinig benzeen aanwezig was voor representatieve metingen is benzeen toegevoegd vanuit een anaërobe stockoplossing (eindconcentratie 1 mg/l).

De flesjes zijn vervolgens stilstaand en in het donker geïncubeerd bij kamertemperatuur. Op verschillende tijden zijn monsters genomen voor analyses op benzeen en sulfaat, afhankelijk van het verloop van de afbraakprocessen. De tijdsduur van de batchexperimenten is afhankelijk van de snelheid van de biologische processen.

De concentratie benzeen is bepaald middels headspace analyse. Hierbij is 250 µl monster uit de gasfase van de batches genomen en geanalyseerd met GC-FID. De benzeenanalyses zijn gedurende het experiment steeds op dezelfde flessen uitgevoerd. De sulfaatanalyses zijn uitgevoerd op vloeistofmonsters met behulp van spectrofotometrie.

4.3 Specifieke intermediaire analyses

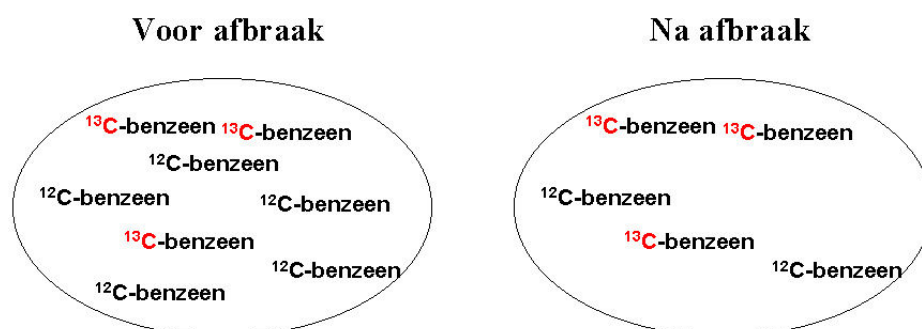
De ervaring leert dat onder anaërobe condities bij de afbraak van aromaten, waaronder benzeen, intermediaire zoals benzoaten en (alkyl)fenolen ophopen. De hypothese is dat deze intermediaire duiden op afbraak, maar dat deze afbraak vertraagd is (of zelfs gelimiteerd). Dit duidt in ieder geval op een gedeeltelijke afbraak, waarmee wordt aangetoond dat de afbraak van aromaten wel kan verlopen. Vaak worden deze intermediaire aangetroffen op locaties waar voorheen gunstigere redoxcondities (bijvoorbeeld sulfaatreducerende condities) heersten, maar waar door verbruik van sulfaat een limitatie is opgetreden. Deze limitatie kan mogelijk relatief eenvoudig worden opgeheven door toevoeging van een elektronenacceptor. Op deze wijze kunnen de betreffende intermediaire een indicator zijn voor een mogelijke aanpak. Uit onderzoeksresultaten op andere locaties is bekend dat de intermediaire

alkylfenolen en benzoaten alleen kunnen worden aangetoond als er minimale concentraties van enkele honderden µg/l aan benzeen of BTEX op de locatie aanwezig zijn.

Naast intermediair metingen die nu worden uitgevoerd, zoals benzoaat, methylbenzoaat en fenolen, zijn er in de anaërobe afbraakroute van benzeen ook andere verbindingen die gevormd kunnen worden, bv benzylsuccinaat. In dit project zijn, naast analyses op (alkyl)fenolen en benzoaten, ook analyses op deze component uitgevoerd.

4.4 Verbindings specifieke stabiele isotopen analyses

Een alternatief voor de concentratiemetingen om verdwijning van de uitgangsstof in het veld te kwantificeren biedt het feit dat verbindingen – en dus ook verontreinigingen - van nature bestaan uit verschillende stabiele isotopen. Koolstofverbindingen bestaan bijvoorbeeld voornamelijk uit “lichte ^{12}C -isotopen“, maar bevatten daarnaast een klein percentage aan zware ^{13}C -isotopen, terwijl gechlloreerde verbindingen naast ^{35}Cl - ook ^{37}Cl -isotopen bevatten. Ook bevatten organische verbindingen voornamelijk het lichte ^1H -isotoop, maar ook een klein gedeelte aan zwaardere ^2H -isotopen. Het is bekend dat micro-organismen verbindingen met veel lichte isotopen preferentieel afbreken, waardoor in het geval van koolstof de verhouding $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ (de “ $\delta^{13}\text{C}$ -ratio”) van het resterende substraat verandert als het gevolg van afbraak (Fig 4.1).



Figuur 4.1 Verandering van de verhouding $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ als gevolg van biologische afbraak

Vastgesteld is dat niet-biologische processen zoals verdunning en adsorptie geen invloed hebben op de $\delta^{13}\text{C}$ -ratio. Vervluchtiging kan wel een effect hebben op de fractionering, maar dit proces speelt in het (diepe) grondwater geen rol. Door gebruik te maken van verbinding specifieke, stabiele isotopen analyse is het mogelijk om de mate van afbraak van deze verbinding in veldmonsters direct aan te tonen. Deze methode kijkt specifiek naar één verbinding en gaat alleen uit van de ratio en is hierdoor onafhankelijk van de concentratie van een verbinding. Deze analyses zijn uitgevoerd met behulp van een GC-IRMS in het TNO-lab.

4.5 Specifieke moleculaire analyses

Monsters van de verschillende locaties zijn gebruikt voor moleculaire analyses. Hiermee zijn zogenaamde DGGE patronen gemaakt om een indruk te krijgen van de diversiteit aan microbiële populaties die op een locatie aanwezig zijn. Voor een DGGE analyse is alle DNA uit een monster geëxtraheerd en vermenigvuldigd met een PCR reactie (Polymerase Chain Reaction). Het verkregen DNA product is op gel gescheiden, waarbij een bandjespatroon

ontstaat. In theorie wordt één bandje op de gel veroorzaakt door één bacteriesoort die in het oorspronkelijke monster aanwezig was. De patronen van de verschillende locaties zijn met elkaar vergeleken, om een indruk te krijgen van de overeenkomsten en verschillen tussen de verschillende locaties en om de invloed van de sulfaatdosering (uitgevoerd in het SKB project SV-604) op de ontwikkeling van de bacteriepopulatie (kwalitatief) inzichtelijk te maken.

Daarnaast is gekeken naar de soorten die in de verschillende monsters worden aangetroffen. Hiervoor zijn dominante bandjes uit de gel geïsoleerd en is de basepaar volgorde van het DNA uit deze bandjes vastgesteld. Met behulp van een database is de bacteriesoort geïdentificeerd en is vastgesteld of deze bacteriën betrokken (kunnen) zijn bij de anaërobe benzeenafbraak.

5 Vries-4

De locatie Vries-4 is een NAM locatie die in het verleden is gebruikt als proeflocatie voor het SKB project SV-604, waarin het effect van sulfaatdosering op de afbraak van benzeen is vastgesteld. Hiervoor zijn na de dosering monitoringen uitgevoerd, waarin onder andere is gekeken naar de concentraties aan verontreiniging, redoxcondities en vorming van tussen- en eindproducten (alkylfenolen, benzoaten, alkaliniteit en sulfide). Uit de verzamelde gegevens bleek dat de dosering van sulfaat de afbraak van benzeen stimuleert. Voor meer details wordt verwezen naar het eindrapport van SKB project SV-604.

5.1 Uitgevoerde werkzaamheden Vries-4

Op de locatie Vries-4 zijn de volgende werkzaamheden uitgevoerd:

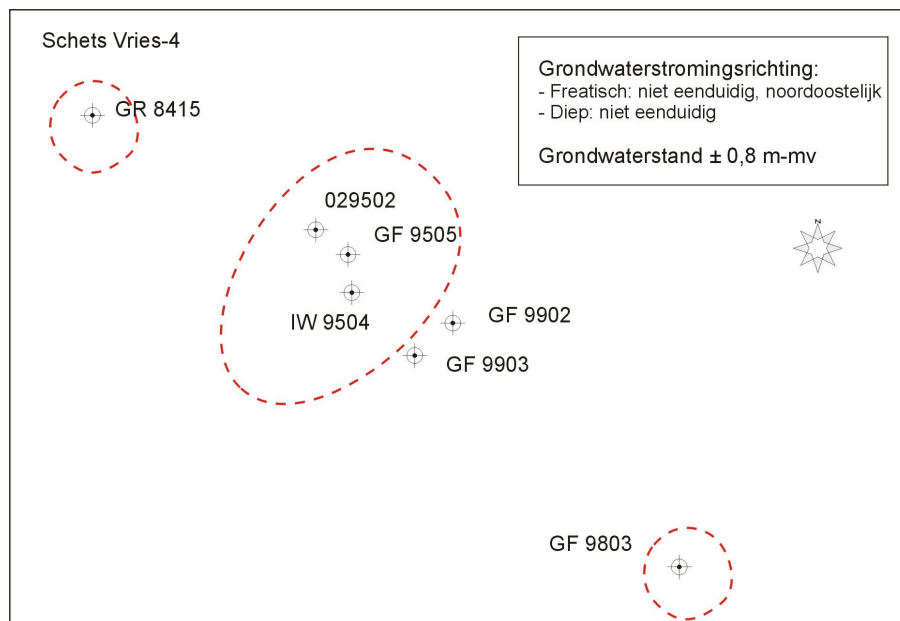
- Grondwaterkarakterisatie op 22 februari 2005 (vaststellen redoxomstandigheden, concentraties BTEX, afbraakproducten en verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses);
- Anaërobe afbraaktesten;
- Moleculaire analyses.

In tabel 5.1 is een overzicht gegeven van de bemonsterde peilbuizen en de uitgevoerde analyses. Een schematisch overzicht staat in figuur 5.1, de locatietekening staat in bijlage A.

Tabel 5.1 Overzicht bemonsterde peilbuizen Vries-4

peilbuis	filter (m-mv)	on-line	nitraat, sulfaat	BTEX	isotopen-analyse	water afbraaktest	afbraakproducten	afbraakproducten	moleculair (EtOH)
bestaand									
029502	2-3	B	T	T	T		T	B	B
GF9803	2-3	B	T	T	T		T	B	B
GR8415	0,7-2,7	B	T	T	T		T	B	B
nieuw									
GF9902	2-3	B	T	T	T	T	T	B	B
IW9504	1-3	B	T	T	T	T	T	B	B
GF9903	5-6	B	T	T	T	B	T	B	B
GF9505	6-7	B	T	T	T	B	T	B	B

B=Bioclear, T=TNO



Figuur 5.1 Schematische weergave van de ligging van de gebruikte peilbuizen. De stippellijn geeft de streefwaarde contour aan.

Uit de geselecteerde peilbuizen zijn voor alle analyses grondwatermonsters genomen. Analyses op nitraat, sulfaat en BTEX zijn uitgevoerd op alle grondwatermonsters. De analyse op afbraakproducten hangt af van de aanwezige concentratie BTEX.

Uit alle peilbuizen is grondwater genomen voor het inzetten van een afbraaktest. De grondmonsters voor de afbraaktesten zijn geselecteerd op basis van de resultaten van de nitraat, sulfaat en BTEX analyses. Van de in oktober 2004 geplaatste peilbuizen zijn grondmonsters aanwezig (tabel 5.2), van de bestaande peilbuizen is geen grondmonster aanwezig, maar voor de zekerheid zijn hier ook grondwatermonsters voor afbraaktesten uit meegenomen.

In tabel 5.2 is aangegeven welke grondmonsters beschikbaar zijn voor afbraaktesten. Tevens is hierin het laatste analyseresultaat voor benzeen op grondwater uit de corresponderende peilbuis opgenomen, en is aangegeven welke monsters door TNO en welke monsters door Bioclear zijn gebruikt voor de batchexperimenten.

Tabel 5.2 Beschikbare en gebruikte monsters voor afbraaktesten

Steekbus codering	diepte steekbus (m-mv)	datum aanlevering	corresponderende peilbuis (m-mv)	laatste analyseresultaat benzeen ($\mu\text{g/l}$)	afbraaktest uitgevoerd door
0900285998	3,0-3,4	25-10-'04	GF9902 (2-3)	< 1,0	TNO
0900285999	3,0-3,4	21-10-'04	IW9504 (1-3)	6,2	TNO
0900286000	4,0-4,4	25-10-'04	GF9903 (5-6)	< 1,0	Bioclear
0900286001	4,5-4,9	25-10-'04	GF9505 (6-7)	0,5	Bioclear

5.2 Resultaten Vries-4

5.2.1 Grondwaterkarakterisatie Vries-4

De resultaten van de grondwaterkarakterisatie zijn weergegeven in tabel 5.3.

Tabel 5.3 Resultaten grondwaterkarakterisatie Vries-4; februari 2005

parameter	029502*	GF9803	GR8415	GF9902	IW9504*	GF9903	GF9505*
omschrijving							
filterstelling (m-mv)	2,0-3,0	2,0-3,0	0,7-2,7	2,0-3,0	1,0-3,0	5,0-6,0	6,0-7,0
pH (-)	7,6	6,1	7,1	7,2	6,5	7,4	6,9
temperatuur (°C)	5,6	7,2	6,5	8,1	4,7	9,6	11,1
geleidbaarheid (µS/cm)	324	166	215	214	130	259	442
redoxpotentiaal (mV t.o.v. H ₂)	137	267	169	172	150	173	173
zuurstof (mg/l)	0,1	0,1	0,1	0,1	2,9	0,2	0,1
nitraat (mg/l)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	1,4	< 0,5	< 0,5
sulfaat (mg/l)	4,0	11	2,3	5,4	7,5	6,3	23,9
methaan (µg/l)	< 5	< 5	< 5	< 5	8,8	< 5	< 5
< 2,0benzeen (µg/l)	270	220	530	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0
tolueen (µg/l)	< 2,0	<	42	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0
ethylbenzeen (µg/l)	<	2,1	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0
m-xyleen (µg/l)	<	4,5	18	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0
p-xyleen (µg/l)	59	2,3	6,1	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0
o-xyleen (µg/l)	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0
benzylsuccinaat	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
fenol (µg/l)	1,1	2,6	29	-	-	-	-
totaal cresolen (µg/l)	< 0,3	< 0,3	5,8	-	-	-	-
C2-alkylfenolen (µg/l)	1,7	< 0,9	1,1	-	-	-	-
C3-alkylfenolen (µg/l)	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	-	-	-
C4-alkylfenolen (µg/l)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
benzoaten (µg/l)	< 5,0	< 5,0	< 5,0	-	-	-	-

*: peilbuizen uit het gestimuleerde gebied tijdens het SKB-project SV-604

<: kleiner dan de detectielimiet

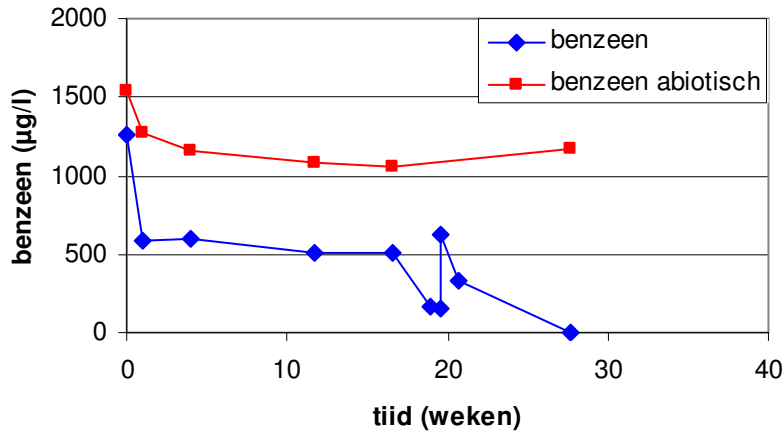
-: niet gemeten

De peilbuizen 029502, IW9504, en GF9505 staan in het gebied dat tijdens het SKB project is gestimuleerd met sulfaat. De peilbuizen GF9902, GF9903, GF9803 en GR8415 staan daarbuiten. De redoxcondities lijken nu in alle peilbuizen vergelijkbaar te zijn, ongeacht of er in het verleden (2002) wel of geen sulfaat is toegevoegd.

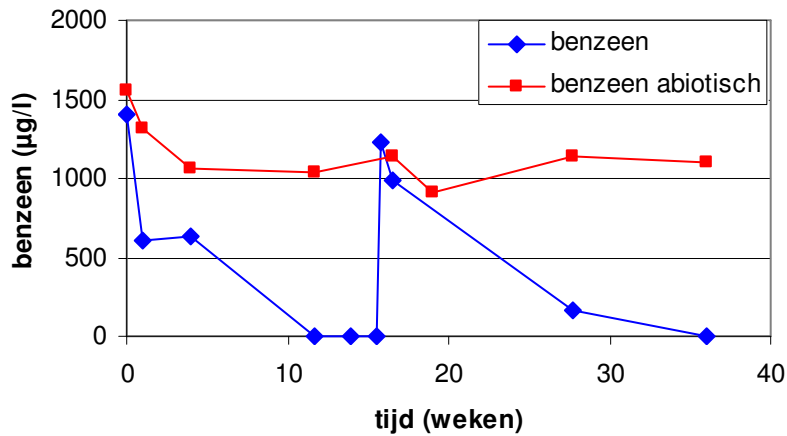
Opvallend bij deze metingen zijn de lage grondwatertemperaturen. Ook bij de aanvullende bemonstering van 5 januari 2006 (voor BTEX- en isotopen analyses) zijn lage temperaturen gemeten. Bij eerdere monitoringen zijn hogere temperaturen gemeten (9,6-14,8 °C).

5.2.2 Afbraaktesten Vries-4

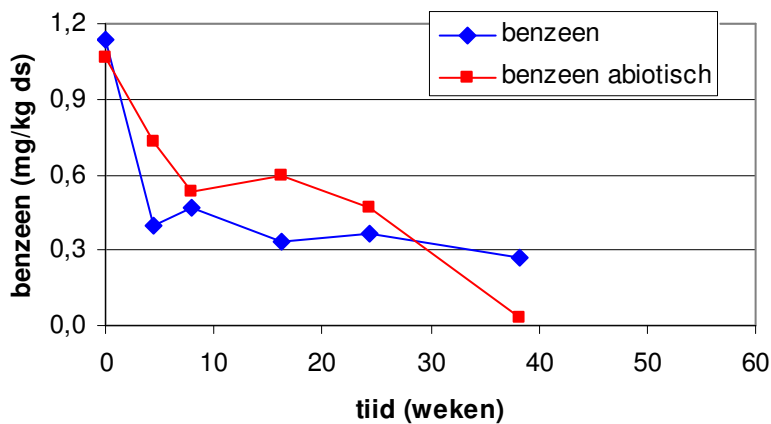
De afbraaktesten zijn uitgevoerd met de beschikbare grondmonsters en corresponderende grondwatermonsters. De resultaten van de afbraaktesten zijn weergegeven in figuur 5.2 tot en met 5.5.



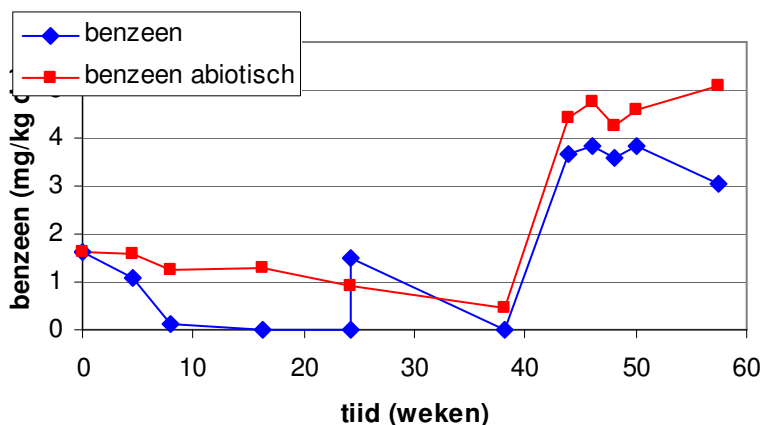
Figuur 5.2 Resultaten afbraak benzeen (grondmonster 0900285998 en grondwater uit peilbuis GF9902). Op $t=0$ en 19,5 is benzeen toegevoegd.



Figuur 5.3 Resultaten afbraak benzeen (grondmonster 0900285999 en grondwater uit peilbuis IW9504). Op $t=0$ en 15,5 is benzeen toegevoegd.



Figuur 5.4 Resultaten afbraak benzeen (grondmonster 0900286000 en grondwater uit peilbuis GF9903)



Figuur 5.5 Resultaten afbraak benzeen (grondmonster 0900266001 en grondwater uit peilbuis GF9505). Op t=0, 24 en 44 is benzeen toegevoegd, op t=59 is extra sulfaat toegevoegd

Uit de figuren volgt dat in 3 van de 4 ingezette experimenten met materiaal van Vries-4 afbraak van benzeen in de batches optreedt. Afbraak van benzeen met grond en grondwater van GF9903 (figuur 5.4) is niet aangetoond. Een verklaring hiervoor is de ligging van GF9903; deze peilbuis is als controle peilbuis geplaatst buiten de vlek en het grondwater uit deze peilbuis is voor zover bekend nooit verontreinigd geweest met benzeen.

In de batches met grond en grondwater van GF9505 bleek dat de afbraak van benzeen na de tweede dosering van benzeen niet op gang kwam. Aanvullende analyses wezen uit dat er geen sulfaat meer aanwezig was. Daarom is op t=59 opnieuw sulfaat toegevoegd, waarna de benzeenafbraak op gang kwam. Dit is een aanwijzing dat op de locatie Vries-4 de anaërobe afbraak van benzeen verloopt met sulfaat als elektronenacceptor.

5.2.3 Specifieke stabiele isotopen analyses

Op de locatie is op meerdere tijdstippen de concentratie benzeen bepaald, zie tabel 5.4. De analyseresultaten zijn gebruikt om geschikte monsters voor stabiele isotopen analyses te selecteren. Wat opvalt, is dat de concentraties benzeen fluctueren. Een verklaring hebben we hier niet voor.

Tabel 5.4 Beschikbare en gebruikte monsters voor isotopen analyses

datum Tijd (weken)	Filterstelling (m-mv)	jul-01 0	nov-04 152	feb-05 164	sep-05 190	jan-06 206
029502*	2,0-3,0		140	270	160	< 2
IW9504*	2,0-3,0		6	< 2		
GR8415	0,7-2,7	990	400	530	1100	31
GF9505*	2,0-3,0			< 2	< 2	
GF9803	1,0-3,0		740	220	2000	< 2
GF9902	5,0-6,0		< 2	< 2	< 2	
GF9903	6,0-7,0		< 2	< 2	< 2	

*: peilbuizen uit het gestimuleerde gebied tijdens het SKB-project SV-604

De monsters van februari en september 2005 zijn bewaard. Hiervan is in 029502, GR8415 en GF9803 nog benzeen aanwezig, waarvan alleen 029502 in het gestimuleerde gebied ligt. Helaas is in peilbuis 029502 tijdens de januari-ronde in 2006 geen benzeen meer aanwezig, waardoor er geen stabiele isotopen analyses op uit te voeren zijn. De meetronde van januari 2006 was verrassend omdat in geen van de monsters benzeen meer is aangetroffen. Een duplo analyse van dezelfde monsters een week later gaf hetzelfde resultaat, behalve voor peilbuis GR8415, waar een lage concentratie benzeen werd aangetroffen bij heranalyse. Vanwege de lage resultaten van de benzeenanalyses en omdat deze peilbuis niet in het gestimuleerde gebied lag, is besloten om op de monsters uit deze peilbuis geen stabiele isotopen analyse uit te voeren.

Het interpreteren van monsters in een stroombaan of in de tijd is door deze lage concentraties niet mogelijk, omdat alleen het februari 2005 monster van pb 029502 beschikbaar was. Het monster van pb 029502 van september 2005 is door Geofox genomen en geanalyseerd en niet meer aanwezig om stabiele isotopen analyses op uit te voeren. Daarom is dit monster niet gebruikt voor stabiele isotopen analyses.

5.2.4 Specifieke intermediaire analyses

Zoals weergegeven in tabel 5.3 zijn de mogelijke intermediaire benzy succinaat en benzoaat niet aangetroffen in de grondwatermonsters. Alleen het mogelijke intermediaire fenol is in lage concentraties aangetroffen in het grondwater uit de peilbuizen 029502 en GR8415.

In het SKB-project SV-604 is op de locatie Vries-4 geen fenol gemeten wanneer benzeen met sulfaat wordt afgebroken. Pas tijdens de laatste monitoringsronde, wanneer de concentraties sulfaat zijn gedaald en methanogenese gaat overheersen (bevestigd door een stijgende concentratie methaan), werd in een aantal peilbuizen fenol gemeten. De aanwezigheid van (alkyl)fenolen is hiermee een aanwijzing dat afbraak optreedt, maar dat de omstandigheden minder gunstig zijn door gebrek aan een geschikte elektronenacceptor (nitraat, ijzer(III) of sulfaat) waardoor de snelheid van afbraak laag is (en tussenproducten zich ophopen). Het feit

dat de verontreiniging met name uit benzeen bestaat en alleen fenol is gevonden als tussenproduct duidt op de specifieke vorming van fenol uit benzeen. De gegevens zijn echter niet voldoende om fenolvorming als bewijs voor anaërobe benzeenafbraak te kunnen gebruiken.

Om de mogelijke vorming van (alkyl)fenolen en benzoaten tijdens de anaërobe afbraak van benzeen te verifiëren zijn analyses uitgevoerd op twee batches met materiaal uit peilbuis GF9505. Deze analyses zijn uitgevoerd op de biologisch actieve batch en op de abiotische batch na 60 weken incubatie (zie ook figuur 5.5). Uit de analyses op benzeen blijkt dat op dit moment actieve afbraak van benzeen in de biologisch actieve batch optrad. Wanneer inderdaad vorming van fenol als intermediair optreedt tijdens de anaërobe afbraak van benzeen mag verwacht worden dat in de biologisch actieve batch fenol aanwezig is. De analyseresultaten bevestigen dit echter niet; in beide batches worden alleen 3,4-dimethylfenol gemeten in lage concentraties (0.13 mg/kg ds in de biologisch actieve batch en 0.14 mg/kg ds in de abiotische batch).

Het feit dat fenol alleen wordt gemeten wanneer methanogene condities overheersen zou kunnen verklaren waarom geen fenol is gemeten in de biologisch actieve batch van GF9505; door de extra toevoeging van sulfaat overheersen sulfaatreducerende omstandigheden en hoopt fenol niet (meetbaar) op.

Kanttekening bij de interpretatie is dat de analyses op (alkyl)fenolen op NAM locaties niet altijd bruikbaar zijn om de anaërobe afbraak van benzeen aan te tonen, omdat (alkyl)fenolen op NAM locaties ook als oorspronkelijke verontreiniging aanwezig kunnen zijn. Voor de locatie Vries-4 is dit waarschijnlijk niet van belang, omdat fenol niet wordt gemeten wanneer sulfaat aanwezig is en wel wanneer sulfaat daarna is uitgeput. Fenol is daarom waarschijnlijk niet als oorspronkelijke verontreiniging aanwezig.

5.2.5 Moleculaire analyses

Monsters van de locatie Vries-4 zijn op DGGE gel gebracht om de biodiversiteit te bepalen. De DGGE is uitgevoerd met universele primers. Hierbij zijn DNA-extracten van monsters gebruikt voorafgaand aan de dosering van sulfaat, en één jaar na de dosering van sulfaat. Voor analyse zijn monsters geselecteerd van peilbuizen die beïnvloed zijn door de dosering, en één monster van een peilbuis die niet was beïnvloed. Tevens zijn monsters van een afbraaktest van een gasfabrieksterrein en van een sulfaatreducerende kolom uit het NOBIS project Slochteren/Schoonebeek in bewerking genomen, waarin de anaërobe afbraak van benzeen werd onderzocht.

De profielen van de gel met bovengenoemde monsters zijn vergeleken met de profielen van de locaties Roswinkel en Johannes Postkazerne. Hierin zijn geen duidelijke overeenkomsten gevonden tussen de profielen die wijzen op een of enkele organismen die aanwezig zijn wanneer anaërobe benzeenafbraak optreedt.

Karakteristieke bandjes uit deze gel zijn gebruikt voor verdere identificatie omdat op de locatie Vries-4 met name benzeen aanwezig is en de afbraaktesten en kolomproef die voor de DGGE analyse zijn gebruikt ook alleen met benzeen als verontreiniging zijn uitgevoerd. Uit de identificatie van de dominante banden van deze DGGE gel bleek dat voornamelijk andere micro-organismen dan sulfaatreducerders aanwezig zijn. In de monsters van de kolom en de afbraaktest zijn organismen als *Rhodoferrax* en *Azoarcus* aangetoond. Opvallend is dat een

aantal klonen overeenkomsten vertonen met organismen die eveneens in de Banisveld landfill zijn aangetoond. De pluim die vanuit deze stortplaats is ontstaan, bevat onder andere verhoogde concentraties BTEX.

5.2.6 Samenvatting Vries-4

Resultaten Vries-4

In onderstaande tabel staan de resultaten van de verschillende analyses op de locatie Vries-4 samengevat. Het resultaat geeft aan of de gebruikte analyse de anaërobe afbraak van benzeen voor de locatie heeft aangetoond. Een negatief resultaat wil niet zeggen dat het optreden van anaërobe afbraak op de locatie Vries-4 wordt ontkracht, omdat door het niet voldoen aan randvoorwaarden (toepassingsvoorwaarden) de resultaten van de analyse niet bruikbaar c.q. betrouwbaar is. De bruikbaarheid of toegevoegde waarde van de analyse voor de locatie Vries-4 staat onder de tabel beschreven.

Tabel 5.5 Overzicht van de resultaten van de analyses op Vries-4

Analyse techniek	Resultaat
Afbraaktesten	+
Intermediair metingen	+/-
Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	ND
Moleculaire analyses	+/-

De afbraaktesten laten zien dat de anaërobe afbraak van benzeen op de locatie mogelijk is. Ook de intermediairmetingen en moleculaire analyses geven aanwijzingen dat de anaërobe afbraak van benzeen mogelijk is op de locatie. Stabiele isotopen analyses waren helaas niet uit te voeren met de beschikbare grondwatermonsters.

Uit de verschillende analyses wordt geconcludeerd dat de anaërobe afbraak op locatie Vries-4 optreedt.

Bruikbaarheid verschillende analyses Vries- 4

De concentratiemetingen in het veld geven fluctuaties van de concentratiemeting te zien. Hierdoor is het moeilijk om conclusies te trekken over het al dan niet optreden van anaërobe afbraak van benzeen. Materiaal van deze locatie is gebruikt in verschillende afbraaktesten, die waardevol zijn gebleken. De afbraaktesten laten duidelijk zien dat de potentie om benzeen anaëroob af te breken op de locatie aanwezig is en dat afbraaktesten een bruikbare methode zijn om de anaërobe afbraak van benzeen aan te tonen.

Of de anaërobe afbraak van benzeen ook daadwerkelijk op de locatie optreedt, is vervolgens met intermediairen analyses aan grondwatermonsters of stabiele isotopen analyses aan te tonen. De gegevens duiden erop dat de aanwezigheid van fenol een aanwijzing is voor (gelimiteerde) afbraak onder methanogene condities. Echter, in het algemeen zijn intermediairmetingen zijn op NAM locaties niet betrouwbaar omdat (alkyl)fenolen op NAM locaties ook als verontreiniging aanwezig kunnen zijn.

De stabiele isotopen analyses zouden de anaërobe afbraak van benzeen verder kunnen onderbouwen, alleen bleken er op de locatie geen geschikte monsters te zijn om stabiele

isotopen analyses aan uit te voeren. Om deze analyses uit te voeren, moeten er monsters in de tijd aanwezig zijn of in een duidelijke stroombaan. Omdat er op de locatie geen duidelijke stroombaan aanwezig was, hebben we er voor gekozen om monsters in de tijd te nemen. Echter, in de laatste monsters van januari is niet of nauwelijks benzeen meer aangetroffen, zodat stabiele isotopen analyses in de tijd niet mogelijk waren. Concluderend, de stabiele isotopen analyses waren op deze locatie niet bruikbaar om de anaërobe afbraak van benzeen aan te tonen omdat onvoldoende benzeen in de monsters aanwezig was.

De moleculaire analyses zijn met goed resultaat uitgevoerd, en identificatie van dominante banden laat zien dat in de profielen inderdaad organismen aanwezig zijn die in de literatuur in verband worden gebruikt met de anaërobe afbraak van aromatische verbindingen. Het zijn echter geen organismen waarvan bekend is dat ze benzeen onder anaërobe condities kunnen omzetten. Het vaststellen van een directe relatie tussen de aanwezigheid van een of enkele organismen en het optreden van anaërobe benzeenafbraak is echter niet mogelijk geweest.

6 Roswinkel

De locatie Roswinkel is een locatie van de NAM, die verontreinigd is met BTEX. Van deze locatie is een algemeen beeld over de lokale redoxcondities bekend. Deze NAM locatie vervangt de locatie Zuiderpolder, omdat op Zuiderpolder saneringsactiviteiten lopen die de uitvoering en interpretatie binnen dit project lastig maken. Door de saneringsactiviteiten zijn er daarnaast te weinig peilbuizen aanwezig met voldoende benzeen.

6.1 Uitgevoerde werkzaamheden Roswinkel

Op de locatie Roswinkel zijn de volgende werkzaamheden uitgevoerd:

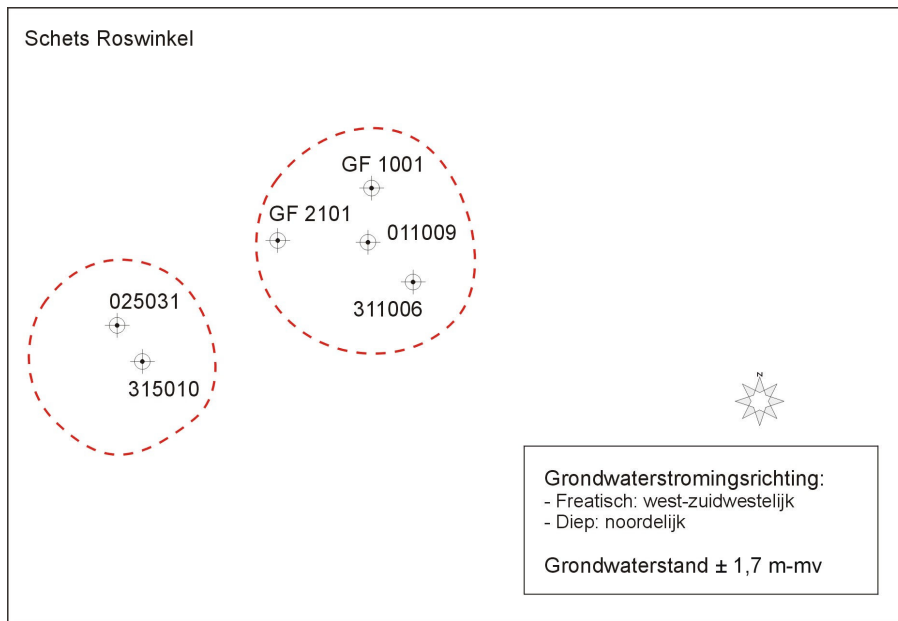
- Grondwaterkarakterisatie op 9 mei 2005 (vaststellen redoxomstandigheden, concentraties BTEX, afbraakproducten en verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses).
- Anaërobe afbraaktesten
Deze zijn begin september 2005 opgestart omdat het benodigde grondmonster pas eind augustus 2005 beschikbaar was;
- Moleculaire analyses.

In tabel 6.1 is een overzicht gegeven van de bemonsterde peilbuizen en de uitgevoerde analyses. Een schematisch overzicht staat in figuur 6.1, de locatietekening staat in bijlage B.

Tabel 6.1 Overzicht bemonsterde peilbuizen Roswinkel

Peilbuis	filter (m-mv)	on- line	nitraat, sulfaat	BTEX	isotopen- analyse	water afbraaktest	afbraakproducten	afbraakproducten	moleculair (EtOH)
installatieterrein									
315010-1	2,0-3,0	B	T	T	T	T	T	B	B
315010-2	7,0-8,0	B	T	T	T		T	B	B
025031-1	4,0-5,0	B	T	T	T		T	B	B
tankenpark									
311006-1	2,0-3,0	B	T	T	T		T	B	B
011009-1	2,0-3,0	B	T	T	T		T	B	B
GF1001	2,0-3,0	B	T	T	T		T	B	B
GF2101	9-10,0	B	T	T	T		T	B	B

B=Bioclear, T=TNO



Figuur 6.1 Schematische weergave van de ligging van de gebruikte peilbuizen. De stippellijn geeft de streefwaarde contour aan.

Uit alle geselecteerde peilbuizen zijn voor alle analyses grondwatermonsters genomen. Analyses op nitraat, sulfaat en BTEX zijn uitgevoerd op alle grondwatermonsters. De analyse op afbraakproducten hangt af van de aanwezige concentratie BTEX.

6.2 Resultaten Roswinkel

6.2.1 Grondwaterkarakterisatie Roswinkel

De resultaten van de grondwaterkarakterisatie zijn weergegeven in tabel 6.2.

Tabel 6.2 Resultaten grondwaterkarakterisatie Roswinkel

parameter	315010-1	315010-2	025031-1	311006-1	011009-1	GF1001	GF2101
omschrijving							
filterstelling (m-mv)	2,0-3,0	7,0-8,0	4,0-5,0	2,0-3,0	2,0-3,0	2,0-3,0	9,0-10,0
pH (-)	6,0	5,5	5,5	6,3	6,5	5,8	5,4
temperatuur (°C)	12,4	11,7	11,3	10,7	11,6	11,8	12,0
geleidbaarheid (µS/cm)	329	203	75	582	521	265	287
redoxpotentiaal (mV t.o.v. H ₂)	261	248	277	289	241	256	234
zuurstof (mg/l)	0,9	0,4	0,3	0,8	0,9	1,2	0,8
nitraat (mg/l)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
sulfaat (mg/l)	6,6	1,5	4,6	2,5	2,3	5,7	13
methaan (µg/l)	2.201	14	10	3.650	15.890	1.471	2.477
benzeen (µg/l)	44.000	7,0	< 2,0	1.600	19	72	76
tolueen (µg/l)	30.000	4,0	< 2,0	18.000	< 2,0	13	< 2,0
ethylbenzeen (µg/l)	2.900	< 2,0	< 2,0	3.800	10	9,0	5,0
m-xyleen (µg/l)	1.100	< 2,0	< 2,0	1.700	27	23	11
p-xyleen (µg/l)	5.800	< 2,0	< 2,0	9.500	80	20	< 2,0
o-xyleen (µg/l)	9.900	< 2,0	< 2,0	14.000	6,0	35	23
δ ¹³ C-ratio benzeen	-	-	-	- 8,4	-28,0	-10,7	-14,8
δ ¹³ C-ratio toluen	-	-	-	-17,2	-20,2	-17,7	
δ ¹³ C-ratio ethylbenzeen	-	-	-	-30,9	-22,9	-22,2	-21,4
δ ¹³ C-ratio m-xyleen	-	-	-	-24,3	-23,5	-21,5	
δ ¹³ C-ratio p-xyleen	-	-	-	-23,9	-25,3	-23,4	
δ ¹³ C-ratio o-xyleen	-	-	-		-24,5	-22,2	-26,5
benzylsuccinaat	5,6	-	-	< 2,6 ¹	-	-	-
fenol (µg/l)	970	-	-	42	-	-	-
totaal cresolen (µg/l)	440	-	-	280	-	-	-
C2-alkylfenolen (µg/l)	510	-	-	960	-	-	-
C3-alkylfenolen (µg/l)	38	-	-	45	-	-	-
C4-alkylfenolen (µg/l)	2,0	-	-	9,9	-	-	-
benzoaten (µg/l)	< 640			< 550			

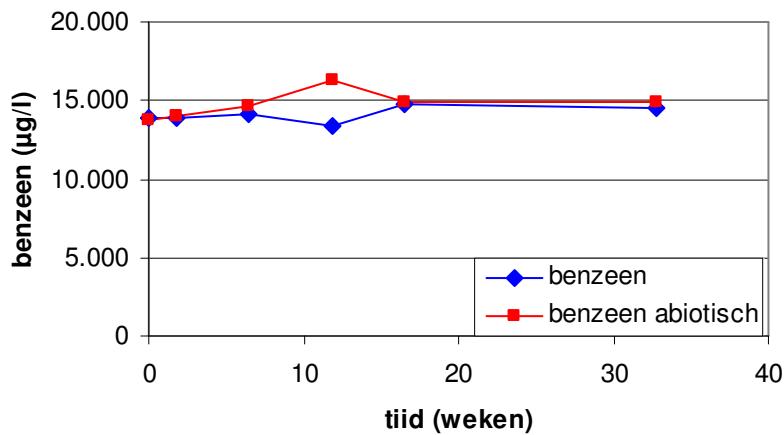
¹: naast de benzylsuccinaat acid piek is een andere piek aanwezig waardoor benzylsuccinaat moeilijk is te bepalen. Indien aanwezig dan is het gehalte niet meer dan in de tabel vermeld.

<: kleiner dan de detectielimiet

-: niet gemeten

6.2.2 Afbraaktesten

De afbraaktesten zijn met één monster uitgevoerd en zijn weergegeven in figuur 6.2.



Figuur 6.2 Resultaten afbraak benzeen (grondmonster in de buurt van en grondwater uit peilbuis 315010-1)

Op de locatie zijn hoge concentraties benzeen aanwezig, er is voor de batchexperimenten dan ook geen extra benzeen toegevoegd. In de figuur is te zien dat er binnen 33 weken geen afbraak van benzeen optreedt met materiaal van de locatie Roswinkel. Ook de andere componenten (tolueen, ethylbenzeen en de xylenen) worden niet in deze batches omgezet.

6.2.3 Intermediären analyses

De benzoaat analyses zijn in deze monsters niet betrouwbaar (de aanwezigheid van storende factoren in het monster leidde tot een detectielimiet van 550 µg/l) en daardoor niet bruikbaar. Fenolen zijn aangetroffen in lage concentraties in de 2 gemeten monsters, net als benzylsuccinaat. De gebruikte monsters zijn geselecteerd vanwege de hoge concentraties BTEX (in ieder geval meer dan enkele honderden µg/l); in de andere peilbuizen zat geen tot weinig BTEX.

De aanwezigheid van alkylfenolen is een aanwijzing dat anaërobe afbraak optreedt, maar omdat alkylfenolen op NAM locaties als verontreiniging aanwezig kan zijn, kunnen hier geen conclusies uit getrokken worden. Benzylsuccinaat is een aanwijzing voor de anaërobe afbraak van benzeen, maar kan ook gevormd worden uit tolueen. Opvallend is wel dat de onderlinge verhouding van de (alkyl)fenolen overeenkomt met de onderlinge verhouding in BTEX componenten. In het grondwater uit peilbuis 315010-1 zijn benzeen, tolueen en xylenen aanwezig (respectievelijk 40.000, 30.000 en 16.800 µg/l). In deze peilbuis is fenol aanwezig in hoge concentraties (970 µg/l) als verwacht afbraakproduct van benzeen. De concentraties cresolen (mogelijk afbraakproduct tolueen) en C2-alkylfenolen (verwacht afbraakproduct xylenen) bedragen respectievelijk 440 en 510 µg/l en zijn daarmee lager dan de concentratie fenol. In het grondwater uit peilbuis 311006-1 is relatief gezien veel minder benzeen aanwezig ten opzichte van tolueen en xylenen, en de concentratie fenol (42 µg/l) is daar ook veel lager ten opzichte van cresolen (280 µg/l) en C2-alkylfenolen (960 µg/l).

De vorming van fenol tijdens de anaërobe afbraak van benzeen is in de literatuur aangetoond, maar de vorming van de verschillende alkylfenolen uit de alkylaromaten (TEX) is niet eenduidig bewezen in de literatuur. Bij de aërobe afbraak van BTEX kunnen deze alkylfenolen echter wel als intermediären optreden.

6.2.4 *Verbindingsspecifieke isotopen analyses*

De specifieke stabiele isotopen analyses zijn uitgevoerd aan 4 monsters die in een stroombaan liggen, zie tabel 6.2. De resultaten voor de meeste componenten zijn wisselvallend. Normaal gesproken ligt de $\delta^{13}\text{C}$ -ratio van benzeen tussen -29 en -26 ‰. In de monsters van Roswinkel wordt voor benzeen een $\delta^{13}\text{C}$ -ratio van -28 ‰ gemeten in peilbuis 011009-1, maar in de overige peilbuizen wordt een waarde van -14,8 tot -8,4 ‰ gemeten. Dit zijn erg vreemde waarden, omdat tot dusver bekend is dat de fractionering van benzeen onder anaërobe condities een maximale fractionering (verandering in $\delta^{13}\text{C}$ -ratio) van 9 ‰ geeft. Uitgaande van een begin waarde van -29 tot -26 ‰ zou dit dus een maximale fractionering van het resterende benzeen van -20 tot -15 ‰ kunnen geven. Oftewel, de benzeen analyses lijken niet betrouwbaar te zijn. De concentraties in de gebruikte monsters waren hoog genoeg voor isotopen analyses, maar de monsters bevatten ook andere verbindingen. Deze hebben mogelijk de benzeen-isotopen analyses verstoord, waardoor deze onbetrouwbaar zijn. Gezien de concentraties in het veld en de resultaten van de batchexperimenten verwachten we ook niet dat er fractionering van benzeen in het veld zal zijn opgetreden.

In overleg met het consortium is bediscussieerd of het nuttig is om in peilbuis 315010 stabiele isotopen analyses uit te voeren om na te gaan of hier een betere waarde te bepalen is. Dit is op zich mogelijk, maar het is bekend dat het aanwezige benzeen in deze peilbuis van een andere bron afkomstig is in vergelijking met de al gemeten peilbuizen. Het resultaat van een enkele peilbuis is ook niet geschikt om een uitspraak te doen over het wel of niet optreden van anaërobe afbraak van benzeen. Daarom is deze analyse niet uitgevoerd.

Ethylbenzeen en m-xyleen laten wel een fractionering zien in de stroombaan. De $\delta^{13}\text{C}$ -ratio van ethylbenzeen stijgt van -30,9 naar -21,4 ‰ en de $\delta^{13}\text{C}$ -ratio van m-xyleen stijgt van -24,3 naar -21,5 ‰. Dit duidt op afbraak van deze verbindingen.

6.2.5 *Moleculaire analyses*

De moleculaire analyses op de locatie Roswinkel laten zien dat de diversiteit van de microbiële populatie erg hoog is. Er zijn grote verschillen tussen peilbuizen in de bronzone en in de pluim. Het is daarom niet mogelijk een of enkele bandjes te selecteren die mogelijk te relateren zijn aan anaërobe benzeenafbraak. Complicerende factor hierbij is dat op de locatie Roswinkel naast benzeen ook TEX aanwezig is, wat de koppeling van een geïdentificeerd organisme aan specifiek anaërobe benzeenafbraak bemoeilijkt. Vergelijking van de profielen van Roswinkel met de profielen van Vries-4 (waar met name benzeen aanwezig is) leverde ook geen overeenkomsten op. Een verdere identificatie van geselecteerde bandjes is daarom niet uitgevoerd.

6.2.6 Samenvatting Roswinkel

Resultaten Roswinkel

In onderstaande tabel staan de resultaten van de verschillende analyses op de locatie Roswinkel samengevat. Het resultaat geeft aan of de gebruikte analyse de anaërobe afbraak van benzeen voor de locatie heeft aangetoond. Een negatief resultaat wil niet zeggen dat het optreden van anaërobe afbraak op de locatie Roswinkel wordt ontkracht, omdat door het niet voldoen aan randvoorwaarden (toepassingsvoorwaarden) de resultaten van de analyse niet bruikbaar c.q. betrouwbaar is. De bruikbaarheid of toegevoegde waarde van de analyse voor de locatie Roswinkel staat onder de tabel beschreven.

Tabel 6.4 Overzicht van de resultaten van de analyses op Roswinkel

Analyse techniek	Resultaat
Afbraaktesten	-
Intermediair metingen	+/-
Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	- *)
Moleculaire analyses	-

*) Onbetrouwbare metingen

De afbraaktesten laten geen afbraak van benzeen zien. Dit wordt bevestigd door de stabiele isotopen analyses, waarbij geen fractionering van benzeen is opgetreden. Uit de intermediaire analyses volgt wel dat er mogelijke intermediaire van benzeen afbraak aanwezig zijn, maar deze componenten kunnen ook als oorspronkelijke verontreiniging aanwezig zijn op NAM locaties. Mede gezien de andere resultaten kan op basis van de aanwezigheid van intermediaire niet worden geconcludeerd dat afbraak van benzeen optreedt. De moleculaire analyses vertonen een grote diversiteit; aanwijzingen voor de aanwezigheid van een of enkele indicator organismen voor anaërobe benzeenafbraak zijn niet gevonden

Uit de verschillende analyses kan worden geconcludeerd dat er geen anaërobe afbraak van benzeen op de locatie Roswinkel optreedt. Wat ons wel verbaast is het feit dat hoge concentraties benzeen aanwezig zijn in de bron en dat er geen pluim is aangetoond.

Bruikbaarheid verschillende analyses Roswinkel

De hoge concentratiemetingen in het veld geven aanwijzingen dat de natuurlijke afbraak van benzeen in de bron hier niet voldoende optreedt om op de locatie NA toe te passen.

De bevestiging dat er geen potentie voor anaërobe benzeenafbraak is, volgt uit de afbraaktesten. Deze tonen aan dat er geen afbraak van benzeen plaats vindt en zijn hierdoor geschikt om een uitspraak te doen over het optreden van anaërobe benzeenafbraak.

Het gebruik van stabiele isotopen analyses om aan te tonen dat er geen benzeenafbraak optreedt, is in principe niet de juiste gang van zaken. De stabiele isotopen analyses kunnen alleen bij positieve resultaten gebruikt worden om een uitspraak te doen over de optredende processen, omdat in theorie niet alle omzettingsreacties een verschuiving in de isotopensamenstelling te zien geven. Zo is bekend dat de aërobe omzetting van benzeen via het enzym monooxygenase wel fractionering geeft, maar via dioxygenases niet. Van de

meeste omzettingsprocessen zijn nog lang niet alle omzettingroutes bekend. Worden positieve resultaten gevonden, dan is er sprake van biologische afbraak. Met de uitgevoerde analyses op deze locatie kan geen uitspraak worden gedaan over NA van benzeen, maar wel van ethylbenzeen en m-xyleen, omdat deze verbindingen een duidelijke fractionering laten zien. Concluderend, de isotopen analyses zijn –gezien de eerdere resultaten- niet geschikt om te gebruiken om op deze locatie een uitspraak te doen over het niet optreden van anaërobe afbraak van benzeen.

De intermediaire analyses zijn wel uitgevoerd, maar zijn op de NAM locatie niet bruikbaar omdat (alkyl)fenolen op NAM locaties ook als verontreiniging aanwezig kunnen zijn. Dit is te zien aan de uitgevoerde analyses, want deze hebben geen duidelijk antwoord kunnen geven over het optreden van anaërobe afbraak van benzeen.

De moleculaire analyses op de locatie Roswinkel zijn goed uitgevoerd. De diversiteit in de monsters is echter erg hoog, waardoor geen specifieke bandjes toegewezen kunnen worden aan mogelijke specifieke benzeenafbrekende micro-organismen.

7 Johannes Postkazerne

De locatie Johannes Postkazerne is een locatie van de Koninklijke Landmacht, en is één van de proeflocaties van SKB-project SV-604 waarin het effect van sulfaatdosering op de anaërobe afbraak van BTEX is vastgesteld. De anaërobe afbraak van BTEX was gebaseerd op sulfide productie en een toenemende benzeenindex (indicatie voor preferentie afbraak TEX). Afbraak van specifiek benzeen kon niet worden bewezen. Een overzicht van de locatie staat in bijlage C.

7.1 Uitgevoerde werkzaamheden Johannes Postkazerne

Op de locatie Johannes Postkazerne zijn de volgende werkzaamheden uitgevoerd:

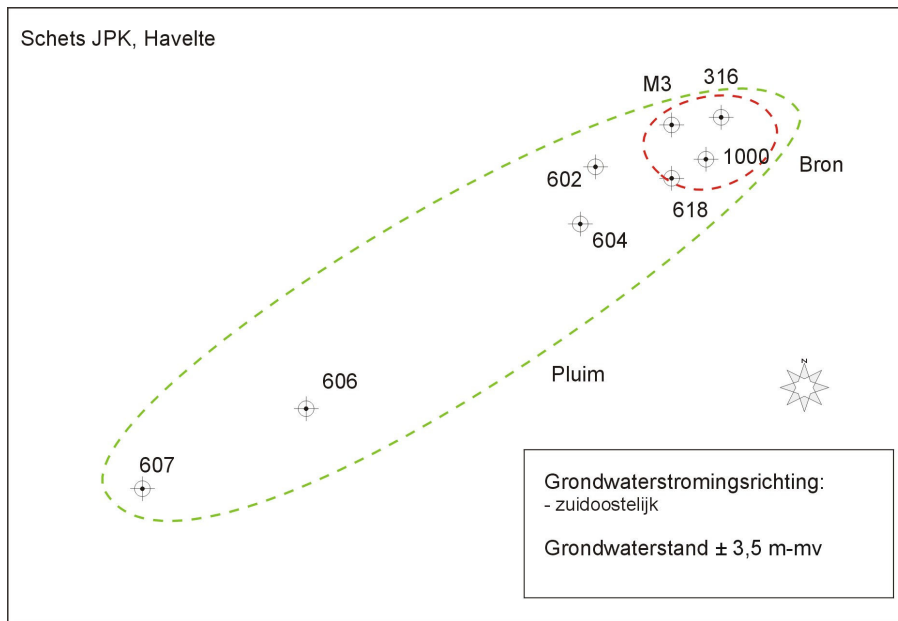
- Grondwaterkarakterisatie op 7 juni 2005 (vaststellen redoxomstandigheden, concentraties BTEX, afbraakproducten en verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses)
- Anaërobe afbraaktesten;
- Moleculaire analyses.

In tabel 7.1 is een overzicht gegeven van de bemonsterde peilbuizen en de uitgevoerde analyses. Een schematisch overzicht staat in figuur 7.1, de locatietekening staat in bijlage C.

Tabel 7.1 Overzicht bemonsterde peilbuizen Johannes Postkazerne

peilbuis	filter (m-mv)	on-line	nitraat, sulfaat	BTEX	isotopen-analyse	water afbraaktest	afbraakproducten	afbraakproducten	moleculair (EtOH)
316-2	9-10	B	T	T	T		T	B	B
M3	13-15	B	T	T	T		T	B	B
1000	9-10	B	T	T	T	B	T	B	B
618	13-14	B	T	T	T		T	B	B
602-2	19-20	B	T	T	T		T	B	B
604-2	21-22	B	T	T	T		T	B	B
606-2	25-26	B	T	T	T		T	B	B
607-2	25-26	B	T	T	T		T	B	B

B=Bioclear, T=TNO



Figuur 7.1 Schematische weergave van de ligging van de gebruikte peilbuizen. De stippellijn geeft de streefwaarde contour aan.

Analyses op nitraat, sulfaat en BTEX zijn door TNO uitgevoerd op alle grondwatermonsters. De analyse op isotopen en afbraakproducten hangt af van de aanwezige concentratie BTEX. De monsters zijn geselecteerd op basis van de analyseresultaten van TNO. Uit peilbuis 1000 is water genomen voor het inzetten van een afbraaktest, van deze peilbuis zijn twee steekbussen met ongeroerde grondmonsters aanwezig.

7.2 Resultaten Johannes Postkazerne

7.2.1 Grondwaterkarakterisatie Johannes Postkazerne

De resultaten van de grondwaterkarakterisatie zijn weergegeven in tabel 7.2.

Tabel 7.2 Resultaten grondwaterkarakterisatie Johannes Postkazerne

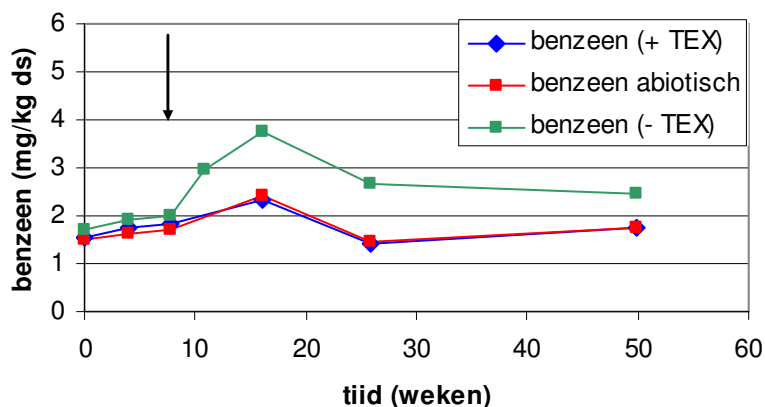
parameter	316-2	M3	1000	618-1	602-2	604-2	606-2	607-2
omschrijving								
filterstelling (m-mv)	9,0-10,0	13,0-15,0	9,0-10,0	13,0-14,0	19,0-20,0	21,0-22,0	25,0-26,0	25,0-26,0
pH (-)	5,4	6,0	5,4	5,2	5,4	5,2	5,2	5,3
temperatuur (°C)	11,4	11,8	11,6	12,4	12,5	12,8	11,5	11,2
geleidbaarheid (µS/cm)	138	527	168	435	455	383	223	289
redoxpotentiaal (mV t.o.v. H ₂)	-81	-124	16	-27	19	-22	-17	13
zuurstof (mg/l)	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,4	0,4	0,4
nitraat (mg/l)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
sulfaat (mg/l)	4,3	4,4	10	110	15	9,1	30	46
methaan (µg/l)	21	29	26	27	112	676	437	222
benzeen (µg/l)	84	5.400	140	90	< 2,0	540	180	220
tolueen (µg/l)	450	38.000	1.900	21	2,2	< 2,0	< 2,0	< 2,0
ethylbenzeen (µg/l)	500	3.900	800	89	21	330	110	55
m-xyleen (µg/l)	630	3.400	740	51	< 2,0	140	< 2,0	< 2,0
p-xyleen (µg/l)	130	8.700	920	< 2,0	23	180	< 2,0	< 2,0
o-xyleen (µg/l)	670	5.700	960	110	< 2,0	230	< 2,0	< 2,0
δ ¹³ C-ratio benzeen	-	-26,3	-	-26,3	-	-26,5	-26,1	-25,8
δ ¹³ C-ratio toluen	-	-25,5	-	-20,2	-	-20,8	-	-
δ ¹³ C-ratio ethylbenzeen	-	-26,4	-	-26,3	-	-26,4	-26,9	-27,1
δ ¹³ C-ratio m-xyleen	-	-26,5	-	-	-	-26,6	-	-
δ ¹³ C-ratio p-xyleen	-	-27,2	-	-27,2	-	-27,2	-	-
δ ¹³ C-ratio o-xyleen	-	-26,4	-	-26,0	-	-26,5	-	-
δD-ratio benzeen		-92,3						?
benzylsuccinaat	-	4,0	-	-	-	< 1,0	-	< 1,0
fenol (µg/l)	-	< 0,5	-	-	-	6,3	-	< 10
totaal cresolen (µg/l)	-	34	-	-	-	1,0	-	< 0,3
C2-alkylfenolen (µg/l)	-	52	-	-	-	14	-	1,3
C3-alkylfenolen (µg/l)	-	2,3	-	-	-	0,5	-	< 0,4
C4-alkylfenolen (µg/l)	-	< 0,3	-	-	-	< 0,3	-	< 0,3
benzoaten (µg/l)	-	52	-	-	-	15	-	< 5

<: kleiner dan de detectielimiet

-: niet gemeten

7.2.2 Afbraaktesten Johannes Postkazerne

De resultaten van de afbraaktesten zijn weergegeven in figuur 7.2. Het materiaal voor de afbraaktesten is afkomstig uit peilbuis 1000 in het brongebied.



Figuur 7.2 Resultaten afbraak benzeen (grond en grondwater uit peilbuis 1000). Op $t=8$ weken is geflushd en opnieuw benzeen gedoseerd.

Na acht weken incubatie trad nog geen afbraak op. Mogelijk werd dit veroorzaakt door de aanwezigheid van TEX (in aanvangsconcentraties van respectievelijk 10, 1 en 4 mg/kg ds), die preferent kunnen worden afgebroken ten opzichte van benzeen. Daarom is besloten twee batches te flushen met stikstof om alle BTEX componenten te verwijderen, en deze batches opnieuw te spiken met benzeen. Zo kan worden nagegaan of de aanwezigheid van TEX inderdaad een negatieve invloed heeft op de afbraak van benzeen. Twee andere batches zijn niet geflushd en onder de oorspronkelijke condities verder geïncubeerd.

De batches vertonen na 50 weken geen positieve resultaten voor de afbraak van benzeen in aan- of afwezigheid van TEX. Ook de TEX componenten worden binnen 50 weken niet afgebroken (resultaten niet weergegeven).

7.2.3 Intermediären analyses

Alle mogelijke intermediären zijn aangetroffen in lage concentraties in de gemeten monsters die in een stroombaan in de pluim liggen.

Ook op deze locatie lijkt er een verband te bestaan tussen de aanwezigheid van fenol en sulfaat (gegevens uit het SKB-project SV-604). Tijdens de nul karakterisatie werden relatief hoge concentraties (alkyl)fenolen gemeten die na de sulfaatdosering afnamen. Daarnaast lijkt ook nu de ratio tussen fenol en alkylfenolen overeen te komen met de ratio tussen benzeen en de overige TEX componenten. In peilbuis M3 is veel TEX aanwezig ten opzichte van benzeen en worden (alleen) cresolen, C2- en C3 alkylfenolen aangetroffen. In peilbuis 604-2 is met name benzeen aanwezig en is ook fenol ten opzichte van de alkylfenolen dominant. In peilbuis 607-2 kan dit helaas niet bevestigd worden omdat de detectielimiet van fenol voor deze analyse verhoogd is.

7.2.4 *Verbindingsspecifieke isotopen analyses*

De specifieke stabiele isotopen analyses zijn uitgevoerd aan 5 monsters die in een stroombaan liggen, zie tabel 6.2. De resultaten voor benzeen geven $\delta^{13}\text{C}$ -ratios van -26,3 tot -25,8 ‰. De variatie tussen de verschillende monsters is groter dan de foutenmarge van de analyses (max. 0,5 ‰), oftewel, de koolstofisotopen analyses vertonen een lichte daling.

Een significantere fractionering is te meten aan de hand van waterstofisotopen. Het is bekend dat bij de afbraak van benzeen en andere aromaten een grotere fractionering optreedt in de waterstof-isotoop (verschuiving in $\delta^2\text{H}$ -ratio; max. 150 ‰) dan in de koolstof-isotoop (verschuiving in $\delta^{13}\text{C}$ -ratio; max. 9 ‰). Het nadeel van de $\delta^2\text{H}$ -ratio analyses is dat de detectielimiet hoger is dan voor $\delta^{13}\text{C}$ -ratio.

Voor $\delta^2\text{H}$ -ratio analyses zijn oude monsters van peilbuis M3 (bron) en 607-2 (pluim) gebruikt, omdat daar volgens de analyses van juni 2005 voldoende benzeen in zat. Helaas bleken deze monsters tijdens de analyse in april 2006 geen (607-2) tot nauwelijks (M3) benzeen te bevatten. Hierdoor is alleen van M3 een waarde bepaald, -92,3 ‰. Deze waarde ligt rond literatuur waardes voor benzeen dat nog niet omgezet is.

Tolueen laat wel een fractionering zien in de stroombaan, want de $\delta^{13}\text{C}$ -ratio stijgt van -25,5 naar -20 ‰. Dit duidt op afbraak van tolueen.

7.2.5 *Moleculaire analyses*

De moleculaire monsters van de Johannes Postkazerne zijn gebruikt voor een DGGE analyse om de microbiële diversiteit in de monsters in kaart te brengen. Uit de resultaten blijkt dat er relatief weinig banden te onderscheiden zijn ten opzichte van de locaties Roswinkel en Vries-4. Ook de intensiteit van de bandjes is lager. De microbiële diversiteit en het totale aantal bacteriën is lager, wat mogelijk veroorzaakt wordt door de 'arme' bodem.

Op de Johannes Postkazerne zijn in monsters uit de bronzone duidelijke banden zichtbaar die in de referentie en in de pluim niet aanwezig zijn. Dit duidt erop dat de bacteriën die met deze bandjes corresponderen op de een of andere manier betrokken zijn bij de aanwezigheid en misschien afbraak van BTEX. Echter, deze bandjes zijn niet aanwezig in de patronen van Roswinkel of Vries-4. De dominante banden in deze profielen bevinden zich op een andere plaats op de gel en corresponderen daarmee met andere bacteriën. Deze bacteriën kunnen daarom niet worden gebruikt als algemeen indicator organisme voor anaërobe benzeenafbraak.

7.2.6 *Samenvatting Johannes Postkazerne*

Resultaten Johannes Postkazerne

In onderstaande tabel staat de samenvatting van de resultaten van de verschillende analyses op de locatie Johannes Postkazerne. Het resultaat geeft aan of de gebruikte analyse de anaërobe afbraak van benzeen voor de locatie heeft aangetoond. Een negatief resultaat wil niet zeggen dat het optreden van anaërobe afbraak op de locatie Johannes Postkazerne wordt ontkracht, omdat door het niet voldoen aan de randvoorwaarden (toepassingsvoorwaarden) de resultaten van de analyse niet bruikbaar c.q. betrouwbaar is. De bruikbaarheid of toegevoegde waarde van de analyse voor de locatie Johannes Postkazerne staat onder de tabel beschreven.

Tabel 7.4 Overzicht van de resultaten van de analyses op Johannes Postkazerne

Analyse techniek	Resultaat
Afbraaktesten	-
Intermediair metingen	+/-
Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	+/-
Moleculaire analyses	-

Uit de verschillende analyses kan niet eenduidig worden geconcludeerd of er anaërobe afbraak van benzeen op de Johannes Postkazerne locatie optreedt.

De batchtesten laten geen afbraak zien, de intermediaire analyses geven aanwijzingen voor anaërobe afbraak van benzeen en de stabiele isotopen analyses laten een kleine afbraak van benzeen zien. Ondanks deze onduidelijke resultaten lijkt de pluim op de locatie zich terug te trekken.

Bruikbaarheid verschillende analyses Johannes Postkazerne

De hoge concentratiemetingen benzeen in de bron en lagere concentraties in de pluim (afnemend met toenemende afstand tot de bron) geven aanwijzingen dat natuurlijke afbraak van benzeen een rol zou kunnen spelen op de locatie.

Een eerste bevestiging voor het optreden van NA kan worden bereikt door het uitvoeren van stabiele isotopen analyses. De $\delta^{13}\text{C}$ -ratio geeft een aanwijzing dat geringe NA van benzeen op de locatie een rol speelt. Helaas is de mate van fractionering maar net iets hoger dan de foutmarge van de analyses, waardoor geen eenduidige conclusies zijn te trekken. Vandaar dat er voor gekozen was om aan de bewaarde monsters ook de $\delta^2\text{H}$ -ratio te bepalen, maar van deze monsters bleek slechts nog een monster geschikt voor de isotopen analyses. Het voordeel van deze analyse is dat een hogere fractionering optreedt in de $\delta^2\text{H}$ -ratio, alleen geldt voor de analyses een hogere detectielimiet. Er kon echter maar van een peilbuis een waarde worden bepaald, zodat we hieruit geen conclusies kunnen trekken. Voor toluen zijn de stabiele isotopen analyses wel bruikbaar om NA op de Johannes Postkazerne aan te tonen.

De afbraaktesten tonen aan dat er geen afbraak van benzeen plaats vindt. De gebruikte monsters voor de experimenten zijn afkomstig uit de bronzone. Mogelijk dat materiaal uit de pluim een ander beeld geeft.

De intermediaire zijn aangetroffen op de locatie. Omdat nog veel TEX op de locatie aanwezig is en deze intermediaire niet specifiek alleen de afbraak van benzeen aantonen, blijft het lastig om intermediaire analyses als bewijs voor benzeenafbraak te gebruiken op deze locatie.

De moleculaire analyses zijn met goed resultaat uitgevoerd, en er zijn verschillen aanwezig in microbiële samenstelling van monsters uit peilbuizen stroomopwaarts van de bronzone, in de bronzone en in de pluim. Een indicator organisme voor anaërobe benzeenafbraak is echter niet geïdentificeerd. Dit is niet mogelijk omdat op deze locatie naast benzeen ook TEX voorkomt, waardoor de aanwezigheid van een bepaald organisme niet gekoppeld kan worden aan benzeenafbraak. Daarnaast is de microbiële diversiteit op de Johannes Postkazerne dermate verschillend van de diversiteit op de locaties Vries-4 en Roswinkel dat geen verbanden gelegd kunnen worden.

8 Conclusies over de bruikbaarheid van de verschillende analyse technieken

In dit project zijn verschillende analysetechnieken met elkaar vergeleken om de bruikbaarheid voor het aantonen van anaërobe benzeenafbraak aan te geven. De interpretatie hiervan wordt bemoeilijkt, doordat op slechts één locatie de afbraak van benzeen duidelijk is aangetoond. Daarnaast bleek de situering van de peilbuizen niet altijd optimaal te zijn voor een goede interpretatie van de uitgevoerde analyses.

In de voorgaande hoofdstukken zijn de resultaten van de analyses beschreven per locatie en is de bruikbaarheid van de analyses voor de onderzochte locaties weergegeven. In dit hoofdstuk geven we de algemene conclusies over de bruikbaarheid van de analysetechniek en de randvoorwaarden (toepassingsvoorwaarden) waar een locatie aan moet voldoen om een bepaalde analyses doeltreffend te gebruiken.

8.1 Afbraaktesten

Met de afbraaktesten voor de locatie Vries-4 is de anaërobe afbraak van benzeen aangetoond en dit komt overeen met de resultaten van de andere analyses.

Voor de locatie Roswinkel en Johannes Postkazerne is geen afbraak van benzeen aangetoond, wat aangeeft dat er geen afbraakcapaciteit in de geteste monsters (uit de bronzone) aanwezig is.

Concluderend kan worden gezegd dat het gebruik van afbraaktesten een goede methode is om het afbraakpotentieel van een locatie vast te stellen. Daarnaast kunnen de afbraaksnelheden tussen verschillende condities met elkaar worden vergeleken, zoals dit wordt gebruikt bij het uittesten van gestimuleerde afbraak (niet in dit project). Voor de afbraaktesten wordt grond en grondwater van een locatie gebruikt en in het lab geïncubeerd. Het is ook mogelijk om alleen grondwater van een locatie te gebruiken, maar dit zal tot gevolg hebben dat het langer duurt voordat de afbraak in de batches start omdat er meer bacteriën in de grond dan in het grondwater aanwezig zullen zijn. Resultaten uit grondwaterbatches zijn vooral te gebruiken bij positieve resultaten; negatieve resultaten kan veroorzaakt worden door een tekort aan bacteriën in het watermonster.

Het nadeel van de afbraaktesten is dat er een bepaalde incubatietijd nodig is (variërend van 1 tot 6 maanden) voordat de resultaten beschikbaar zijn. De afbraak zal de ene keer sneller op gang komen dan in andere gevallen. Afhankelijk van de urgentie van een verontreinigingssituatie op een locatie en de beschikbare tijd voor analyses/vooronderzoek kan voor de afbraaktesten gekozen worden.

8.2 Intermediären analyses

Bij deze analyses is gekeken naar benzoaat, (alkyl)fenolen en benzylsuccinaat, waarbij opgemerkt moet worden dat op de NAM locaties en bijvoorbeeld gasfabrieksterreinen alkylfenolen als oorspronkelijke verontreiniging aanwezig kunnen zijn. Dit kan meestal niet worden uitgesloten en daardoor zijn (alkyl)fenolen vaak niet bruikbaar zijn om benzeen of BTEX afbraak op deze locaties aan te tonen.

Bij de gebruikte monsters zijn ondanks de hoge benzeenconcentraties slechts lage concentraties intermediären aanwezig. Dit komt omdat deze intermediären reactiever zijn dan benzeen en snel kunnen worden omgezet. Om dit te kunnen gebruiken als bewijs voor het

optreden van anaërobe benzeen afbraak is de gevoeligheid van de analyses dan ook van groot belang. Verder is het van belang om grondwatermonsters uit peilbuizen in verontreinigde zone en niet-verontreinigde zone te gebruiken, zodat de intermediaire productie met elkaar kan worden vergeleken.

Daarnaast is al eerder geconcludeerd dat er een verband lijkt te bestaan tussen de aanwezigheid van fenol en sulfaat: als sulfaat aanwezig is worden geen afbraakproducten gemeten maar als de omstandigheden methanogeen worden door uitputting van sulfaat wordt opeens wel fenol gemeten. In de filters waar nog wel sulfaat aanwezig is wordt geen fenol gemeten.

Op twee locaties zijn lage concentraties van intermediaire aangetroffen (Roswinkel en Johannes Postkazerne), maar wijzen de andere resultaten erop dat er niet tot nauwelijks afbraak van benzeen is opgetreden. Het blijft dan ook de vraag hoe specifiek deze verbindingen zijn voor de afbraak van benzeen en/of BTEX, zelfs voor benzylsuccinaat. Uit eerder onderzoek is ook aangetoond dat deze componenten alleen aanwezig zijn wanneer de omstandigheden ongunstig zijn voor NA. De afbraak treedt wel op maar erg langzaam en daardoor hopen lage concentraties tussenproducten zich op.

Concluderend kan worden gesteld dat het gebruik van intermediaire analyses een methode is om biologische activiteit op een locatie vast te stellen, die mogelijk gekoppeld is aan benzeen / BTEX afbraak. Het nadeel is dat deze verbindingen soms ook als verontreiniging worden aangetroffen op niet-actieve locaties. Daarnaast zijn de geanalyseerde intermediaire niet altijd specifiek voor benzeenafbraak; ze kunnen ook gevormd worden tijdens de anaërobe afbraak van toluen, ethylbenzeen en xylenen en zijn daarmee een algemene aanwijzing voor BTEX afbraak. Uit onze resultaten zijn aanwijzingen gevonden voor een koppeling van benzeen aan fenol, toluen aan methylfenol, ethylbenzeen aan ethylfenol en xylenen aan dimethylfenol, maar deze aanwijzingen zijn nog onvoldoende onderbouwd om intermediaire analyses als bewijsvoering te gebruiken.

8.3 Verbindings specifieke stabiele isotopen analyses

Bij de locatie Vries-4 was het niet mogelijk om stabiele isotopen analyses uit te voeren, omdat in de interessante peilbuizen geen benzeen meer aanwezig was. De resultaten op de locatie Roswinkel waren negatief voor benzeen. Er is wel een fractionering opgetreden en aangetoond voor ethylbenzeen en m-xyleen. Ook op de locatie Johannes Postkazerne is een lichte fractionering van benzeen aangetoond, die helaas niet kon worden bevestigd met waterstof-isotopen analyses aan oude monsters. Er is wel een duidelijke fractionering opgetreden en aangetoond voor toluen.

Theoretisch kan het gebruik van waterstof-isotopen een goed alternatief zijn voor koolstof-isotopen, alleen hebben we dat niet kunnen aantonen omdat we geen geschikte monsters hadden (te lage benzeenconcentraties). Het voordeel van waterstofisotopen zit erin dat de absolute fractionering in waterstof veel hoger is (max 150 ‰) dan in koolstof (max 6 ‰). De methode waterstof-isotopen is hiermee gevoeliger, er kan een betere voorspelling over de afbraak worden gedaan, het enige nadeel is de iets hogere detectielimiet.

Het voordeel van deze methode is dat de analyses een direct bewijs zijn om aan te tonen dat er omzetting op de locatie heeft plaatsgevonden en om deze omzetting te kwantificeren. De

analyse vindt direct na monstername plaats, waardoor een snel antwoord mogelijk is op de vraag of omzetting is opgetreden.

Het nadeel van de methode is dat er alleen conclusies uit te trekken zijn bij het optreden van fractionering (afbraak). Als er geen fractionering optreedt, is dit geen bewijs dat er geen afbraak heeft plaatsgevonden. Er kunnen immers omzettingsreacties bij betrokken zijn die geen fractionering opleveren. Verder zijn voor een goede interpretatie voldoende hoge concentraties BTEX en een duidelijke stroombaan of monsters in de tijd enkele randvoorwaardes.

Concluderend kan worden gezegd dat verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses gebruikt kunnen worden om afbraak vast te stellen. Doordat literatuurgegevens bekend zijn over de maximale fractionering van een bepaald omzettingsproces, kan met behulp van deze gegevens en de isotopen analyses aan veldmonsters de afbraaksnelheid en de mate van afbraak worden berekend. Op deze manier is kwantificering van de afbraak in het veld mogelijk.

8.4 Moleculaire analyses

De uitgevoerde moleculaire analyses laten zien dat de DGGE profielen van de locaties onderling duidelijk verschillend zijn. Op de locatie Johannes Postkazerne zijn relatief weinig banden te onderscheiden ten opzichte van de locaties Roswinkel en Vries-4, en ook de intensiteit is lager. De microbiële diversiteit en het totale aantal bacteriën is lager, wat mogelijk veroorzaakt wordt door de 'arme' bodem. Ook per locatie zijn verschillen aanwezig tussen de bemonsterde peilbuizen. Zo zijn op de Johannes Postkazerne in monsters uit de bronzone duidelijke banden zichtbaar die in de referentie en in de pluim niet aanwezig zijn. Dit duidt erop dat de bacteriën die met deze bandjes corresponderen op de een of andere manier betrokken zijn bij de afbraak van BTEX. Echter, deze bandjes zijn niet aanwezig in de patronen van Roswinkel of Vries-4. De dominante banden in deze profielen bevinden zich op een andere plaats op de gel en corresponderen daarmee met andere bacteriën.

De geïdentificeerde organismen uit enkele banden uit het DGGE profiel van monsters van Vries-4, een anaërobe afbraaktest met benzeen (niet van deze proeflocaties) en monsters van een voormalig gasfabrieksterrein kunnen op basis van literatuurgegevens gekoppeld worden aan aromatenafbraak. Deze organismen kunnen een rol kunnen spelen bij de anaërobe afbraak van BTEX of, meer specifiek, benzeen. De groepen waartoe deze bacteriën behoren zijn echter erg divers en niet beschreven als anaërobe benzeen afbrekers..

Op dit moment is het niet mogelijk één organisme of groep van organismen te koppelen aan BTEX afbraak in het algemeen of afbraak van benzeen in het bijzonder. Gezien de diversiteit van de DGGE profielen van de verontreinigde locaties en de verschillen in geïdentificeerde organismen die wel aan aromatenafbraak gekoppeld kunnen worden, wordt ook niet verwacht dat op korte termijn een of enkele 'indicator' organismen geïdentificeerd worden (zoals nu wel het geval is voor reductieve dechlorering van gechlloreerde ethenen).

Moleculaire analyses voor BTEX leveren op dit moment alleen algemene informatie over populatie verschillen tussen referentie, bron en pluim. De analyses hebben geen waarde voor het aantonen van NA capaciteit voor benzeen, omdat de benodigde kennis over verantwoordelijke organismen nog niet bekend is.

8.5 Eindconclusies

In onderstaande tabel staan de gebruikte analyses met hun bruikbaarheid voor het aantonen van de anaërobe afbraak van benzeen weergegeven. Ook de belangrijkste randvoorwaardes (toepassingsvoorwaardes) staan vermeld.

Afbraaktesten	+	Goede methode om afbraakpotentieel vast te stellen! Randvoorwaarde Goede monsternamen in het veld (anaëroob) van grond en grondwater Voordeel Betrouwbare resultaten Nadeel Lange wachttijd voor positief resultaat
Intermediaire analyses	+/-	Methode om het optreden van afbraak op de locatie vast te stellen. Randvoorwaarde Grondwatermonsters uit peilbuizen in verontreinigde zone en niet-verontreinigde zone hebben de voorkeur. Voordeel Snel resultaat Nadeel Ook aangetroffen op niet-actieve locaties en niet voldoende specifiek voor anaërobe benzeenafbraak
Verbindingsspecifieke stabiele isotopen analyses	+	Methode om het optreden van afbraak op de locatie vast te stellen. Randvoorwaarde Stroombaan nodig of monsters in de tijd! Voordeel Snel resultaat en kwantificering mogelijk. Nadeel Specifieke analyses, specifieke kennis nodig voor interpretatie, geeft alleen informatie bij positieve resultaten
Moleculaire analyses	+/-	Indirecte methode om biologische activiteit vast te stellen, die mogelijk gekoppeld is aan benzeen / BTEX afbraak Randvoorwaarde Kennis over verantwoordelijke bacteriën nodig, die er nu nog niet is. Voordeel Redelijk snel resultaat Nadeel Zie randvoorwaarde, alleen bij gebruik van grondwatermonsters binnen en buiten bron/pluimgebied algemene uitspraken te doen.

Op basis van de resultaten lijkt de volgende strategie bruikbaar op locaties die zijn verontreinigd met benzeen, met name voor locaties waar een inschatting nodig is voor het optreden van natuurlijke afbraak:

Aan de hand van concentratiemetingen op de locatie in de tijd ontstaat een eerste aanwijzing voor afbraak van benzeen. De volgende stap bestaat uit een redoxkarakterisatie om de overheersende redoxcondities vast te stellen en om te bepalen of elektronenacceptoren verbruikt worden. Het verbruik van elektronenacceptoren is een tweede aanwijzing voor het optreden van afbraak van de verontreiniging in het algemeen. Vervolgens zijn stabiele

isotopen analyses een methode om er achter te komen of in het veld afbraak van de afzonderlijke componenten is opgetreden. Tonen de stabiele isotopen analyses fractionering aan, dan is dit een bewijs dat de afbraak op heeft getreden. Geven de stabiele isotopen analyses geen fractionering te zien, dan is er onvoldoende bewijs voor het optreden van benzeenafbraak. In dat geval zullen anaërobe afbraaktesten uitgevoerd moeten worden. Anaërobe afbraaktesten zijn ook het eerste alternatief dat wordt ingezet als door omstandigheden (geen stroombaan, geen goede tijdreeks) geen betrouwbare isotopen analyses uitgevoerd kunnen worden.

We kiezen er bewust voor om eerst stabiele isotopen analyses aan te bevelen. Allereerst is dit een goedkopere meting dan het uitvoeren van afbraakexperimenten, maar ook omdat de stabiele isotopen analyses (in een pluim) bij het gebruik van grondwatermonsters in een stroombaan de afbraak processen over een lange tijdsperiode weergeven. De tijdsduur van batchexperimenten varieert van 3 tot max. 12 maanden, terwijl de stabiele isotopen analyses bij een pluim van 30 jaar oud daadwerkelijk inzicht geven in de afbraakprocessen in die tijdsperiode. Dit is met name bij langzame afbraakprocessen zoals anaërobe afbraak van benzeen van belang.

De intermediaire analyses en moleculaire analyses geven op dit moment voor anaërobe benzeen afbraak niet voldoende betrouwbare resultaten om te gebruiken als een hard bewijs voor de anaërobe afbraak van benzeen.

Deze voorgestelde aanpak gaat alleen op voor locaties waar inzicht nodig is in het optreden van natuurlijke afbraak. Kiest men voor gestimuleerde afbraak omdat natuurlijke afbraak niet of onvoldoende snel optreedt, dan kan de haalbaarheid hiervan in batchexperimenten worden uitgetest voordat dit in het veld wordt toegepast. Stabiele isotopen analyses kunnen vervolgens, als de gestimuleerde afbraak in het veld wordt getoetst, worden gebruikt om het verloop van het afbraakproces in het veld te volgen.

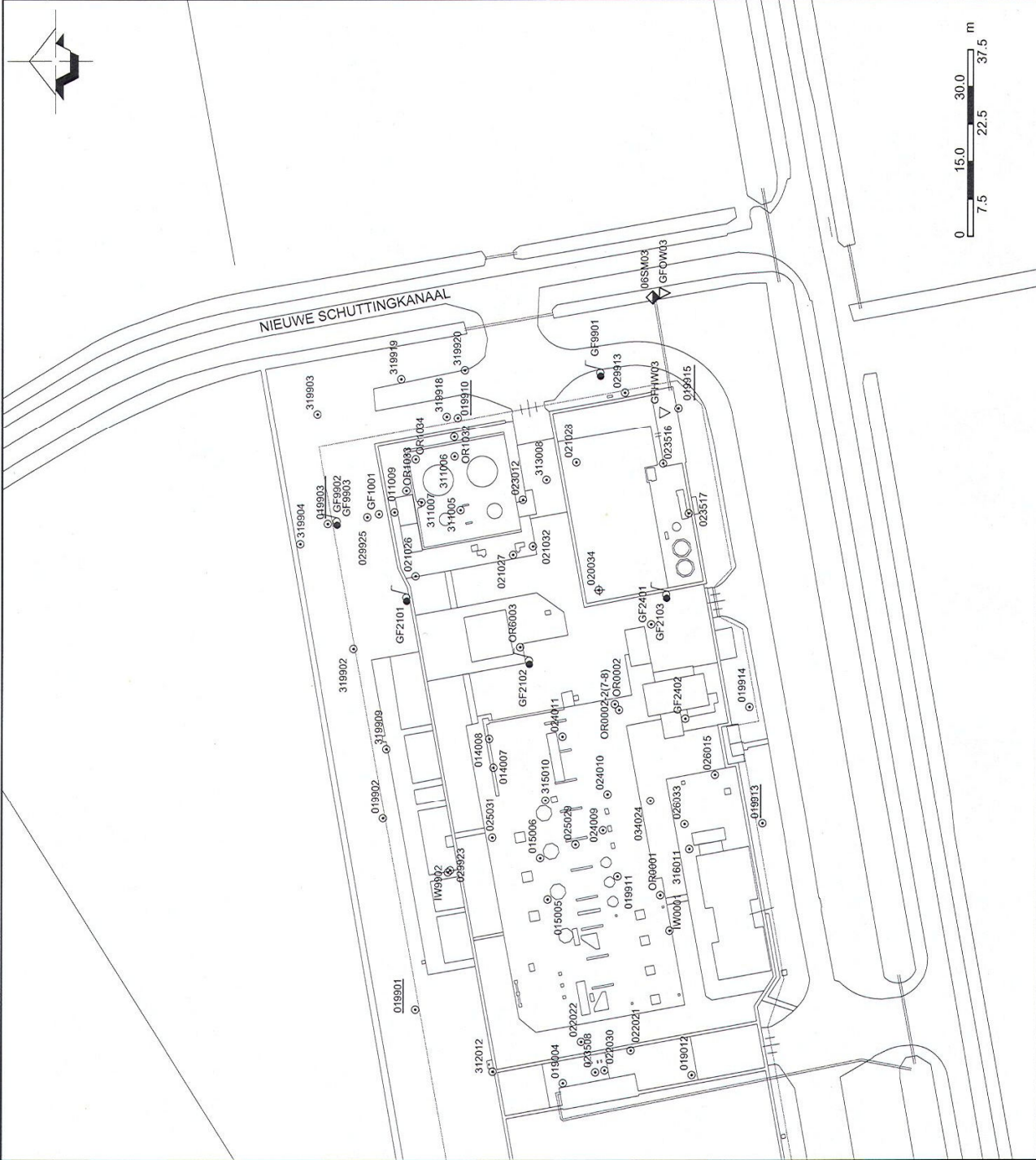
Moleculaire analyses zijn in dit stadium niet geschikt, omdat ze voor BTEX op dit moment alleen algemene informatie geven over populatie verschillen tussen referentie, bron en pluim. De benodigde kennis over de verantwoordelijke organismen is nog niet bekend.

Bijlage A

Locatie Vries 4

Bijlage B

Locatie Roswinkel



Legenda

- minifilter
- peilbuis
- waterbodemmonster
- hoekbak- / sloot-watermonster

nummer SoDM peilbuis

Omschrijving: **Situering monsternamepunten**
 Bijlage: **1.1A**

Project: **Roswinkel 4 (oost)**

Opdrachtgever: **NAM Asset ELK**

Projectnummer: **20050129/ESTA**

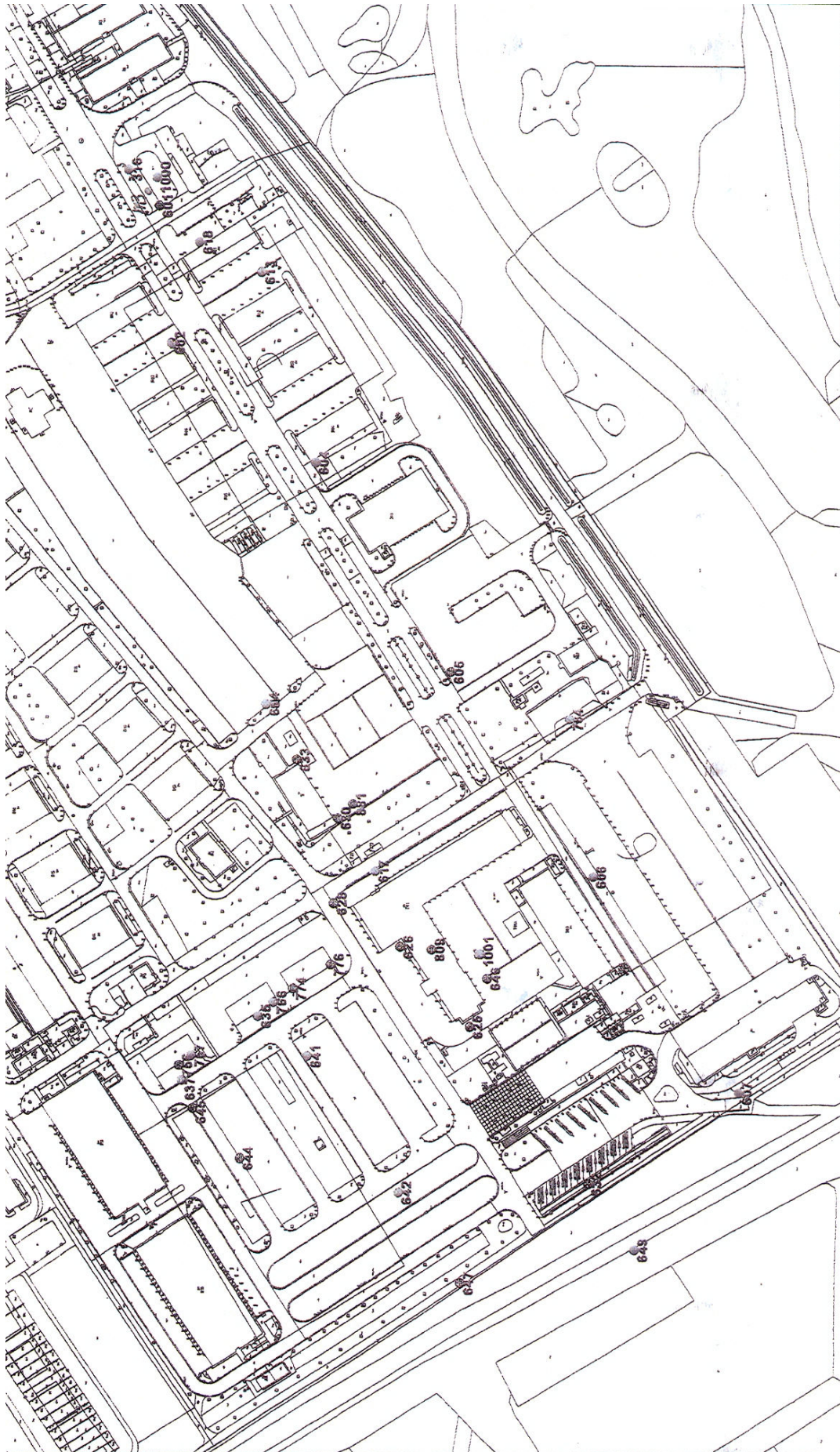
Tekenaar: **TVLO** Schaal: **A3** Datum: **14-09-05**
 Formaat: **A3** Accoord:

GEOTECHNISCHE ADVISEURS
Geofox-Lexmond
 vestiging Oostvaardersplassen
 Postbus 271
 7970 AE Oostvaardersplassen
 T: (0541) 82 28 35
 www.geofox-lexmond.nl
 info@geofox-lexmond.nl



Bijlage C

Locatie Johannes Postkazerne



Opdrachtgever Ministerie van Defensie	Schaal 1 : 2 000	Status Concept
Project Havella JPK actualisatie grondwater	Formaat A3 287x420	Projectnummer 4384467
	Dat. 26.5.2005 8:17	Tekeningnummer P00032
	Geak. BOM	
	Geo. mmk	

