

Meervoudige validatie van *in situ* biodegradatie

Auteurs: Harry Veld
Alette Langenhoff
Jan Gerritse

Datum: April 2010

**Eindrapportage
ISOTRAP – PT 7434**



Samenvatting

Het voorliggende rapport beschrijft de resultaten van een studie naar de bruikbaarheid van Bio-traps om natuurlijke afbraak van contaminanten *in situ* te kunnen aantonen.

Monitoring van *in situ* biologische afbraak is van essentieel belang voor de implementatie van natuurlijke afbraakconcepten bij verontreinigde grondwatersystemen. De gebruikelijke methoden voor het aantonen van afbraak van bodemverontreinigingen zijn gebaseerd op het meten van de afname in concentratie van de uitgangsstof, het identificeren en kwantificeren van tussen- en/of eindproducten, of op het aantonen van (actieve) microbiële populaties. Sinds enkele jaren worden stabiele isotopenmetingen succesvol toegepast voor het vaststellen en kwantificeren van natuurlijke of gestimuleerde afbraak. Nadeel van de techniek is dat wel eenduidig aangetoond kan worden dat afbraak heeft plaatsgevonden, maar niet of er momenteel nog afbraak plaatsvindt. Voor dit laatste zal op verschillende momenten in de tijd gemeten moeten worden.

Recentelijk is een nieuwe methode geïntroduceerd om natuurlijke afbraak van een aantal contaminanten aan te tonen, de zgn. Bio-trap techniek. Bij deze techniek worden *in situ* batchproeven, isotopenmetingen en de identificatie van de microbiële populatie in slechts één bemonstering gecombineerd. Deze bemonstering wordt uitgevoerd in een Teflon buisje gevuld met zgn. Bio-Sep Beads. Deze gepatenteerde korrels hebben een zeer groot intern oppervlak (porositeit) en bestaan uit een mengsel van actief koolstof en een polymeer. Het geheel fungeert als een “passive sampler”

De kern van de hier gebruikte Bio-trap techniek is het feit dat de korrels in het laboratorium worden geladen met bijvoorbeeld benzeen, toluen of MtBE welke een verhoogde concentratie ^{13}C heeft t.o.v. de natuurlijke concentratie. Deze ^{13}C wordt vervolgens ingebouwd in de bacteriële biomassa indien er daadwerkelijk afbraak van de bovengenoemde componenten optreedt.

Één of meerdere Bio-traps worden gedurende enkele weken of maanden in het (verontreinigde) grondwater geplaatst, bijvoorbeeld in een peilbuis. Als de in de bodem en het grondwater aanwezige bacteriën de Bio-traps koloniseren en de toegevoegde verontreiniging *in situ* consumeren zal het ^{13}C -koolstof ingebouwd worden in bacteriële biomassa. Door vervolgens in het laboratorium de stabiele koolstofisotopenratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of $\delta^{13}\text{C}$) van de vetzuren in de biomassa op de korrels te meten, kan de incorporatie van het ^{13}C hierin bepaald worden. Hiermee is de *in situ* biodegradatie van de verontreiniging aangetoond. Bovendien is aangetoond dat de afbraak gedurende de tijd dat de Bio-trap in het grondwater aanwezig was, heeft plaatsgevonden.

Natuurlijk koolstof bestaat uit een mengsel van de isotopen koolstof-12 (^{12}C ; 98,89%), koolstof-13 (^{13}C ; 1,11%) en een heel klein beetje (minder dan 0,001%) koolstof-14. De eerste twee zijn stabiel, de laatste isotoop is radioactief. Als nagenoeg alle koolstof bestaat uit ^{13}C zal de isotopenratio (verhouding tussen ^{13}C en ^{12}C) een niet-natuurlijke zeer sterk positieve waarde hebben.

Het gebruik van Bio-traps is op vier verschillende locaties in Nederland getest: Froombosch (benzeen), Bergen (benzeen) Nijmegen (MtBE), en Aalten (tolueen). Voor alle locaties kon de inbouw van ^{13}C in vetzuren van bacteriën worden gemeten en daarmee het optreden van biologische afbraak worden aangetoond.

In Hoofdstuk 2 worden de afzonderlijke locaties omschreven m.b.t het type verontreiniging. Tevens wordt een motivatie gegeven voor de selectie van de peilbuizen waarin één of meerdere Bio-traps zijn geplaatst. Hoofdstuk 3 geeft achtergrondinformatie over de toegepaste technieken, zoals PLFA (vetzuur) extracties en analyses, isotopenanalyses en DNA analyses. In Hoofdstuk 4 worden de resultaten van componentspecifieke isotopenanalyses gepresenteerd en besproken. Tevens worden hier de conclusies gegeven m.b.t. het optreden van natuurlijke afbraak van de contaminant. In Hoofdstuk 5 worden de resultaten van de DNA analyses gegeven. Belangrijkste conclusie hierbij is dat DNA analyses wel de potentie voor afbraak aantonen maar dat er geen uitspraak gedaan kan worden over de daadwerkelijke activiteit. Hiervoor zouden mRNA analyses uitgevoerd moeten worden.

Hoofdstuk 6 geeft een samenvatting van de conclusies die op basis van de in dit rapport beschreven Bio-trap testen getrokken kunnen worden:

- Via de Bio-trap techniek kan worden vastgesteld dat afbraak van benzeen, tolueen of MtBE plaatsvindt op een locatie. Op basis van de resultaten kan echter niet zondermeer een uitspraak worden gedaan over de afbraaksnelheden.
- Op basis van de resultaten van een Bio-trap analyse uit één peilbuis kunnen geen eenduidige conclusies worden getrokken met betrekking tot het wel of niet optreden van natuurlijke afbraak op de locatie (zie resultaten van Nijmegen en Bergen).
- Er zal meer aandacht moeten worden besteed aan de afgifte van (^{13}C gelabelde) componenten aan het grondwater wanneer gebruik wordt gemaakt van gelabelde Bio-traps. De concentratie van de toegevoegde componenten moet waarschijnlijk meer in overeenstemming worden gebracht met de concentratie van de daadwerkelijke verontreiniging.
- Als je zeer hoge concentraties van ^{13}C gelabelde contaminanten gebruikt in de Bio-traps krijg je mogelijk wel goede inbouw krijgt van ^{13}C in de PLFAs, terwijl als je meer de *in situ* concentraties gebruikt dit niet per definitie het geval hoeft te zijn.

- Door de afgifte van ^{13}C gelabelde component aan het grondwater is het gedurende een bepaalde periode niet zinvol om isotopenmetingen op deze component in het grondwater uit te voeren. De lengte van deze periode is afhankelijk van de omzettingssnelheid en grondwaterstroming.
- Indien meerdere Bio-traps in een peilbuis worden gehangen kan uitwisseling van de ^{13}C gelabelde component plaatsvinden.
- Voor een goede interpretatie van, vooral, DNA data is het noodzakelijk om gegevens te hebben over de redox condities (aerob vs. anaerob)
- Er zal nog nader onderzoek moeten worden verricht naar de incubatietijd van de Bio-traps. Mogelijk dat 6-8 weken niet voldoende is en dat de incubatietijd verlengd zal moeten worden naar bijvoorbeeld een halfjaar.
- De correlaties tussen “afbraak”-genen en gemeten afbraak waren niet altijd even duidelijk in de studie. Het lijkt dan ook dat de DNA analyses niet echt essentieel zijn voor het monitoren of aantonen van afbraak. Een alternatief zou zijn om in plaats van DNA naar mRNA te gaan kijken. mRNA is indicatief voor activiteit, DNA voor potentieel. Een ander alternatief is om de DNA toename in de tijd te volgen.
- Het feit dat de Bio-trap techniek door een patent is gedekt kan een obstakel zijn voor een bredere en kostengunstige toepassing



Dankwoord

De uitvoering van dit project is mede mogelijk gemaakt door de inbreng en medewerking van een groot aantal mensen. Wij danken daarom de volgende personen voor de financiële ondersteuning, inhoudelijke commentaren en suggesties, het beschikbaar stellen van de locatie en locatiegegevens, het uitvoeren van bemonsteringen of het uitvoeren van de diverse analyses:

Arno Peekel (SKB), Michiel Pluim (Gemeente Den Haag), Wilfred Röling (VU Amsterdam), Kerry Sublette (University of Tulsa), Gregg Williams (Envirogene), Mieke Heyde (Envirogene), Anja Sinke (BP), Eddie Meijer (BP), Ronny Hilhorst (HMVT), Nanne Hoekstra (Deltares), Egbert Wesselink (Shell), Roy Hofstede (Arcadis), André Cinjee (Deltares), Geert Arnoldussen (Koole), Emille Marnette (TAUW), Erik Schrier (TAUW), Bas van der Zaan (Deltares), Simone Morelis (Deltares) en Kathrin Reimer (Deltares).



Inhoudsopgave

1	Inleiding.....	11
1.1	Probleemstelling.....	11
1.2	Bio-trap concept.....	12
2	Locaties.....	15
2.1	Locatie Froombosch.....	15
2.1.1	Omschrijving.....	15
2.1.2	Selectie van peilbuizen.....	19
2.2	Locatie Bergen.....	19
2.2.1	Omschrijving.....	19
2.2.2	Selectie van peilbuizen.....	20
2.3	Locatie Aalten.....	21
2.3.1	Omschrijving.....	21
2.3.2	Selectie van peilbuizen.....	21
2.4	Locatie Nijmegen.....	23
2.4.1	Omschrijving.....	23
2.4.2	Selectie van peilbuizen.....	25
2.5	Samenvatting locaties.....	26
3	Toegepaste analysetechnieken.....	27
3.1	Bio-traps en labeling.....	27
3.2	Phospholipid Fatty Acid analyses (PLFA).....	27
3.3	Componentspecifieke stabiele isotopen analyse (CSIA).....	29
3.4	DNA analyse (qPCR).....	30
4	Component Specifieke Isotopen Analyses.....	33
4.1	Benzeenreactor.....	33
4.2	Froombosch.....	34
4.3	Bergen.....	36
4.4	Aalten.....	37
4.5	Nijmegen.....	38
5	DNA Analyses.....	43
5.1	Eubacteriën.....	43
5.2	Benzeenreactor.....	45
5.3	Froombosch.....	45
5.4	Bergen.....	46
5.5	Aalten.....	47
5.6	Nijmegen.....	47
6	Conclusies en aanbevelingen.....	49
7	Literatuur.....	51



1 Inleiding

Gestimuleerde of natuurlijke afbraak is een *in situ* techniek welke in toenemende mate gebruikt voor de sanering van verontreinigde locaties. De daadwerkelijke afname van verontreinigingen (de vracht) in verontreinigde aquifers wordt voornamelijk bepaald door microbiële processen. Een goede inschatting van *in situ* biodegradatie is daarom van essentieel belang voor de implementatie van natuurlijke afbraakconcepten bij verontreinigde grondwatersystemen

1.1 Probleemstelling

De gebruikelijke methoden voor het aantonen van afbraak van bodemverontreinigingen zijn gebaseerd op het meten van de afname in concentratie van de uitgangsstof, het identificeren en kwantificeren van tussen- en/of eindproducten of op het aantonen van (actieve) microbiële populaties.

Deze methoden voldoen echter niet altijd. De concentratieafname van de uitgangsstof is vaak niet te relateren aan biologische afbraak omdat in de bodem ook andere (abiotische) processen (adsorptie, verdunning, vervluchtiging) van belang zijn. Bovendien is het voor het kwantificeren van afbraaksnelheden in het veld noodzakelijk de concentraties van verontreinigingen over een periode van vaak vele jaren te volgen.

Het meten van specifieke afbraakproducten zoals het meten van VC en etheen bij de anaërobe dechlorering van CKW's, is voor vele andere verbindingen (BTEX, PAK, minerale olie) niet mogelijk. Hier zijn verschillende redenen voor. Zo is bijvoorbeeld veelal onbekend wat de mogelijke tussenproducten zijn. Ten tweede worden tussenproducten vaak slechts in zeer lage, moeilijk detecteerbare concentraties gevormd. Ten derde kunnen de ontstane tussenproducten afkomstig zijn van verschillende verbindingen, dit fenomeen is vooral lastig wanneer verontreinigingen in mengsels voorkomen. En ten vierde zijn vele tussenproducten eenvoudig afbreekbaar waardoor aanwezige concentraties niet representatief zijn voor de afbraak van het oorspronkelijke product.

Ook de 'standaard' technieken die gebruikt worden voor het aantonen van (actieve) microbiële populaties zijn controversieel. Plate counts en Most Probable Number (MPN) tellingen zijn slechts indicatief en batch-incubaties worden onder atypische omstandigheden in het laboratorium uitgevoerd. Bovendien is het niet zeker of de aangetoonde populaties specifiek een rol spelen bij de omzetting van de verontreinigingen omdat ze in de bodem bijvoorbeeld natuurlijke substraten gebruiken in plaats van de verontreinigingen.

Sinds enkele jaren worden stabiele isotopenmetingen succesvol toegepast voor het vaststellen en kwantificeren van natuurlijke of gestimuleerde afbraak. Deze methode maakt gebruik van een verschuiving in isotopenratio (fractionering) van de verontreinigingen (uitgangsstoffen) om vast te stellen of daadwerkelijke afbraak van de desbetreffende verbinding heeft plaatsgevonden. De mate van fractionering varieert per verbinding, per redox conditie, per afbraakmechanisme en gemeten isotoop. Het is een goede methode om natuurlijke afbraak in het veld aan te tonen. Nadeel van de techniek is dat wel eenduidig aangetoond kan worden dat afbraak heeft plaatsgevonden, maar niet of er momenteel nog afbraak plaatsvindt. Voor dit laatste zal op verschillende momenten in de tijd gemeten moeten worden.

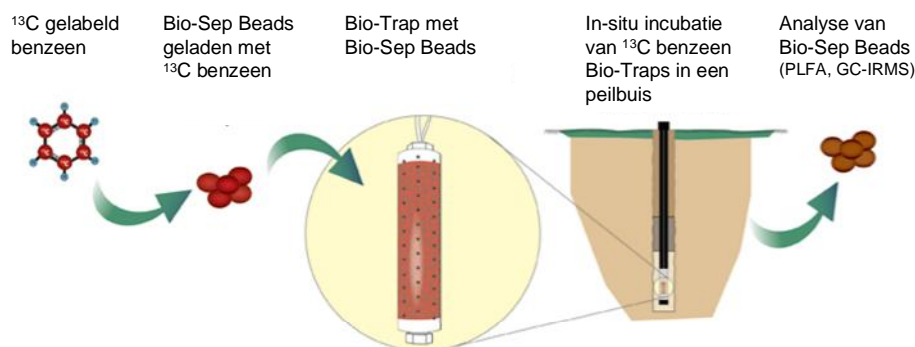
Samenvattend kan gezegd worden dat er nog een aantal knelpunten of onzekerheden is in het aantonen van natuurlijke afbraak:

1. afname van concentratie is niet alleen het gevolg van biodegradatie;
2. het meten van afbraakproducten en tussenproducten is niet altijd mogelijk;
3. bacterie tellingen en batch-incubaties met de actieve microbiële populaties zijn op zijn best indicatief,
4. stabiele isotopenmetingen tonen wel aan dat er afbraak heeft plaatsgevonden, maar geven niet per definitie de actuele situatie weer.

Recentelijk is een nieuwe *in situ* techniek geïntroduceerd die van groot belang kan zijn voor een goede inschatting van het afbraakpotentieel, nl. de Bio-trap techniek.

1.2 Bio-trap concept

Bij deze techniek worden *in situ* batchproeven, isotopenmetingen en de identificatie van de microbiële populatie in slechts één bemonstering gecombineerd. Deze bemonstering wordt uitgevoerd in een Teflon buisje gevuld met zgn. Bio-Sep Beads (zie Figuur 1). Deze korrels hebben een zeer groot intern oppervlak (porositeit) en bestaan uit een mengsel van actieve koolstof en een polymeer (Geyer et al., 2005; Chang et al., 2005; Busch-Harris et al., 2006; Busch-Harris et al., 2008; Sublette et al., 2006)



Figuur 1 Schematisch overzicht van het Bio-trap concept (zie www.microbe.com)

De korrels worden in het laboratorium geladen met een bepaalde concentratie van bijvoorbeeld ^{13}C gelabeld benzeen, toluen of MtBE. Vervolgens worden één of meerdere buisjes gedurende enkele weken of maanden in het grondwater geplaatst, bijvoorbeeld in een peilbuis. Als de in de bodem en het grondwater aanwezige bacteriën de Bio-traps koloniseren en de toegevoegde verontreiniging *in situ* consumeren zal het ^{13}C -koolstof ingebouwd worden in bacteriële biomassa. Door vervolgens in het laboratorium de stabiele koolstofisotopenratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of $\delta^{13}\text{C}$) van de vetzuren in de biomassa op de korrels te meten, kan de incorporatie van het ^{13}C hierin bepaald worden. Hiermee is de *in situ* degradatie van de verontreiniging aangetoond. Bovendien is aangetoond dat de afbraak gedurende de laatste weken of maanden heeft plaatsgevonden, nl. gedurende de tijd dat de Bio-trap in het grondwater aanwezig was.

De eerder genoemde nadelen en problemen van batch incubaties en component specifieke isotopenmetingen worden door deze Bio-traps grotendeels opgelost. Tevens is de noodzaak tot het meten van concentraties over een lange periode (monitoring) met meerdere tijdstippen om natuurlijke afbraak aan te tonen vrijwel overbodig geworden.

De voordelen van de Bio-trap methode t.o.v. bestaande technieken om biologische afbraak aan te tonen kunnen als volgt worden samengevat:

1. Bij de Bio-trap methode worden geen concentraties gemeten en er hoeft geen monitoring (meerdere monsternames) van het grondwater plaats te vinden.
2. Bemonstering vindt plaats door de Bio-traps gedurende een periode in een peilbuis te hangen (weken tot maanden). Voordeel hierbij is dat, in tegenstelling tot de bemonstering bij de andere technieken, mogelijke fluctuaties in afbraakomstandigheden, concentraties, etc. opgevangen worden door de langdurige *in situ* incubatie.
3. Biodegradatie wordt onomstotelijk aangetoond doordat ^{13}C koolstof van de contaminant ingebouwd wordt in de biomassa (vetzuren) van de bacteriën die aanwezig zijn in het bodemcompartiment. Tevens wordt via deze techniek aangetoond dat biodegradatie plaatsvindt onder de daadwerkelijke veldomstandigheden waaraan de Bio-traps zijn blootgesteld. Hiermee is tevens aangetoond dat de biodegradatie heeft plaatsgevonden gedurende de incubatieperiode en dat de microbiële populaties dus actief zijn.
4. Afbraaksnelheden kunnen bepaald worden door meerdere Bio-trap buisjes te gebruiken en deze op verschillende tijdstippen uit de peilbuis te verwijderen. Door Bio-traps op verschillende dieptes te hangen in een peilbuis kan (potentiële) biodegradatie van verschillende zones in het bodemcompartiment bepaald worden. Aanname hierbij is dus dat de verschillende zones in het bodemcompartiment ook vertegenwoordigd zijn in de peilbuis.

Het vertalen van de meetresultaten - of die nu afkomstig zijn van laboratorium-experimenten of bestaan uit *in-situ* bepalingen - naar het gehele bodemcompartiment blijft een aandachtspunt waar in de praktijk ervaring mee moet worden opgebouwd. De aanwezigheid van een peilbuis alleen al zal de natuurlijke situatie altijd enigszins beïnvloeden. Het neerlaten van meetinstrumenten in een peilbuis zal ook een verstrend effect hebben. De situatie in een peilbuis zal niet helemaal de ondergrond nabootsen omdat je te maken hebt met factoren als de doorlaatbaarheid van peilbuizen, oxidatie op het raakvlak water/lucht, e.d. Juist omdat de Bio-trap bemonsteringsbuisjes gedurende langere tijd in de peilbuis aanwezig zijn zal er evenwicht ontstaan tussen de buisjes en de 'natuurlijke' omgeving. Dit is een stap vooruit t.o.v. traditionele bemonsteringen.

Een ander belangrijk aandachtspunt bij de toepassing van Bio-traps die geladen zijn met ^{13}C gelabelde componenten is het feit dat er een hoeveelheid component van de Bio-trap in het grondwater terecht kan komen. Voor Bio-traps die geladen zijn met benzeen is het verlies na 30 dagen ongeveer 5%, terwijl dit voor MtBE 20% tot 40% kan zijn (Busch-Harris, 2008). Dit betekent dat er dus ook een hoeveelheid ^{13}C gelabeld benzeen of MtBE in het grondwater terecht zal komen, waardoor het monitoren van afbraak met stabiele isotopenmetingen ná gebruik van een Bio-trap voor een lange tijd niet meer mogelijk zal zijn.

In dit project wordt de Bio-trap techniek in Nederland geïntroduceerd door een aantal testen op vier veldlocaties (Aalten, Bergen, Nijmegen en Froombosch) en middels een laboratoriumtest met een reactor waarin gecontroleerde anaerobe biodegradatie van benzeen plaatsvindt.

Er bestaat een patent op de zgn. Bio-Sep Beads. Dit is een door de Universiteit van Tulsa (dr. Kerry Sublette) ontwikkeld product in opdracht van DuPont. Het patent is eigendom van de Universiteit van Tulsa. De DNA analyses worden op commerciële basis uitgevoerd door Microbial Insights Inc., dat een licentie heeft voor het gebruik van de Bio-Sep Beads van de Universiteit van Tulsa. Microbial Insights heeft inmiddels een Europese vertegenwoordiger gevonden in Envirogene Ltd, UK. Met dit laboratorium zijn, in het kader van het huidige project, duidelijke afspraken gemaakt en Envirogene is een actieve partner in het projectconsortium. De aanwezige patenten vormen daarom in dit project geen enkele belemmering voor het uitvoeren van dergelijke analyses. Voor toekomstige projecten kan de aanwezigheid van een patent mogelijk een prijstechnische belemmering vormen.

2 Locaties

In dit hoofdstuk worden de informatiebladen gepresenteerd van de 4 locaties die gebruikt zijn in het demonstratieproject 'Isotrap – Meervoudige validatie van *in-situ* biodegradatie'. Van alle locaties is in meer of mindere mate bekend wat de concentratie en verspreiding van de contaminant is. Het ontbreken van gegevens met betrekking tot de redox condities (aeroob, anaeroob) is voor het uitvoeren en interpreteren van de Bio-trap testen niet essentieel. Het relateren van de moleculaire data (DNA analyses) aan de Bio-traps wordt door het ontbreken van deze gegevens echter wel bemoeilijkt. Per locatie wordt een overzicht gegeven van de geselecteerde peilbuizen en de gebruikte Bio-traps. In dit project wordt gebruik gemaakt van twee typen Bio-trap.

Voor de daadwerkelijke test worden ^{13}C gelabelde Bio-traps gebruikt en als controle worden zgn. standaard Bio-traps gebruikt. Een standaard Bio-trap bevat wel de korrels (Bio-sep beads) maar geen contaminant. De verwachting is dat op beide typen Bio-traps biofilm gevormd zal worden en dat dus alleen in de gelabelde Bio-traps inbouw van ^{13}C in de vetzuren zal plaatsvinden. Bij de interpretatie van de meetgegevens worden de resultaten van de standaard Bio-traps als 'nulmeting' gebruikt en de resultaten van de gelabelde Bio-traps worden hier mee vergeleken. De beide typen Bio-trap worden alleen in het demonstratieproject gebruikt en in de praktijk volstaat in principe het gebruik van alleen gelabelde Bio-traps om het eventuele optreden van natuurlijke afbraak aan te tonen. Per locatie en per peilbuis zal worden aangegeven welk type Bio-trap is gebruikt.

2.1 Locatie Froombosch

2.1.1 Omschrijving

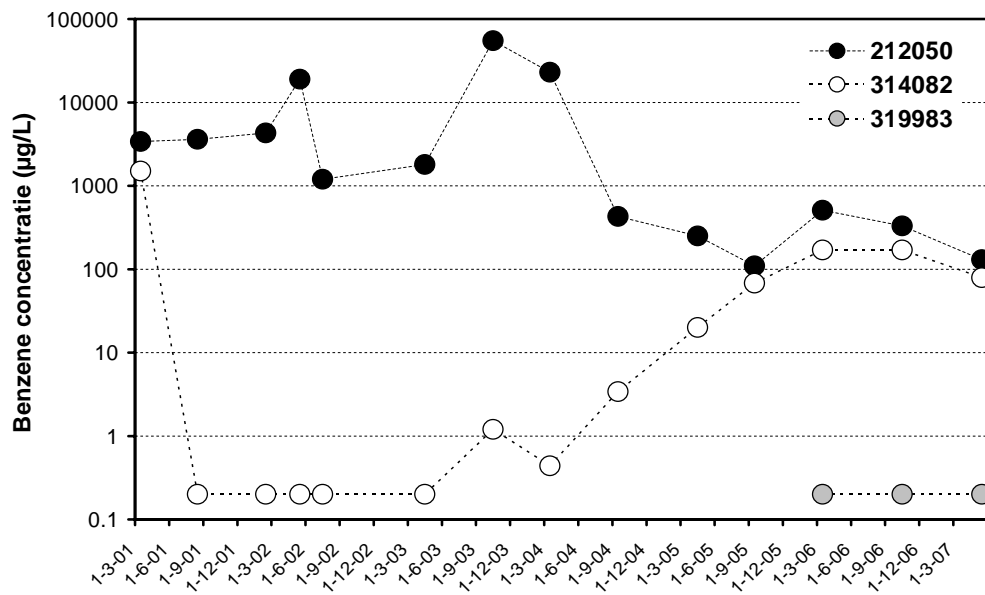
Uit onderzoeken, uitgevoerd vanaf 1989 tot 1995, is gebleken dat het grondwater op de locatie Froombosch (zie Figuur 2 en 3) sterk is verontreinigd met minerale olie en vluchtige aromaten.

Op de locatie is van 1995 tot 2002 een sanering uitgevoerd, door middel van onttrekken en zuiveren van grondwater en bodemlucht. De activiteiten op de locatie bevinden zich nu in fase 2. De nog aanwezige restverontreiniging wordt beheerst en gecontroleerd. Deze periode duurt tot bedrijfsbeëindiging van de locatie.



Figuur 2 Overzicht van de NAM locatie Froombosch

In het kader van de beheersfase vindt er elk jaar een monitoringsronde plaats. Deze worden uitgevoerd door Arcadis. De resultaten van de laatste monitoringsronde staan in Figuur 4 en 5. In meer dan de helft van de peilbuizen is de gemeten concentratie van het benzeen in 2007 beneden de detectielimiet ($< 0.2 \mu\text{g/L}$). De hoogste benzeenconcentraties zijn gemeten in peilbuis 212050 ($130 \mu\text{g/L}$). Ter plaatse van deze peilbuis bevindt zich een kern van verontreiniging. De monitoringsgegevens van drie geselecteerde peilbuizen staan weergegeven in Figuur 5. Voor peilbuis 212050 is een duidelijke afname van de concentratie van het benzeen waarneembaar, terwijl de benzeenconcentratie in peilbuis 314082 juist toeneemt. Het concentratieverloop vertoont ook relatief sterke fluctuaties, die mogelijk te relateren zijn aan wisselende grondwaterstanden.



Figuur 5 Monitoring van de benzeenconcentratie in peilbuis 212050 (skimmer), peilbuis 314082 (glycolunit) en peilbuis 319983 (oostkant van het installatieterrein)

2.1.2 Selectie van peilbuizen

Een overzicht van de geselecteerde peilbuizen voor het uitvoeren van de Bio-trap test op deze locatie staat in Tabel 1.

Tabel 1 Verdeling van de Bio-traps (gelabeld en standaard) op de locatie Froombosch

Peilbuis	Diepte (m)	¹³ C Benzeen Bio-trap	Standaard Bio-trap	Opmerking
212050	1.80 – 2.80	2	1	Deze peilbuis heeft de hoogste concentratie benzeen. De trend van afnemende concentraties kan het gevolg zijn van biodegradatie.
314082	2.50 – 3.50	2	1	Deze peilbuis heeft relatief hoge concentraties benzeen. De trend is echter omgekeerd aan die van peilbuis 212050. Hier neemt de concentratie benzeen toe in de tijd.
319983	2.94 – 3.94	1	1	Referentie. Deze peilbuis kan gebruikt worden om de achtergrondwaarden te bepalen.
Totaal		5	3	

2.2 Locatie Bergen

2.2.1 Omschrijving

De locatie Bergen is de voormalige vuilstort Oosterdijk, welke bestaat uit 4 stortcompartimenten. De stortplaats beslaat een totaal oppervlak van 5,25 hectare en ligt ongeveer 5 meter diep in een 27 meter dikke deklaag.

In, en buiten, deze stort bevindt zich een benzeenverontreiniging. De onderzoeksresultaten suggereren dat er ter hoogte van de stort wel benzeenafbraak optreedt en dat op grotere dieptes onder de stort geen afbraak van benzeen plaatsvindt (zie Tabel 2). De Bio-traps zijn in drie verschillende peilbuizen op verschillende dieptes gehangen om bovenstaande hypothese te testen.



Figuur 6 Overzicht van de voormalige stortplaats Oosterdijk te Bergen

Tabel 2 Overzicht van de BTEX concentraties ($\mu\text{g/l}$) in een aantal beschikbare peilbuizen op de locatie Bergen

Peilbuis	Diepte	Benzeen	Tolueen	Ethylbenzeen	Xylenen (som)
055/012	3.27	<0,20	<0,20	<0,20	<0,50
055/012	8.43	92	0.22	0,20	1,2
055/012	15.30	0,25	<0,20	<0,20	<0,50
055/207	4.00	46	0.84	<0,20	0,70
055/207	9.00	100	0.97	0,32	1,1
055/020	3.30	<0,20	<0,20	<0,20	<0,5

2.2.2 Selectie van peilbuizen

In Tabel 3 is een overzicht gegeven van de geselecteerde peilbuizen en de dieptes waar de Bio-traps zijn gehangen.

Tabel 3 Verdeling van de Bio-traps (gelabeld en standaard) op locatie Bergen

Peilbuis	Diepte (m)	¹³ C Benzeen Bio-trap	Standaard Bio-trap
055/012	3.27	1	1
055/012	8.43	1	
055/012	15.30	1	1
055/207	4.00	1	
055/207	9.00	1	1
055/020	3.30	1	1
Totaal		6	4

2.3 Locatie Aalten

2.3.1 Omschrijving

De locatie Aalten bestaat uit een garagebedrijf met een grondwaterverontreiniging met voornamelijk BTEX componenten. Op basis van eerdere concentratiemetingen is voor deze locatie besloten om te onderzoeken of er natuurlijke afbraak van toluen plaatsvindt. Een overzicht van de aanwezige peilbuizen is gegeven in Figuur 7.

2.3.2 Selectie van peilbuizen

Het grondwater in vier peilbuizen is bemonsterd voor isotopenmetingen op het toluen. Met een isotopenmeting bepaal je de verhouding van de twee stabiele koolstofisotopen (^{12}C en ^{13}C) per individuele component, in dit geval toluen. Bacteriën gebruiken bij voorkeur componenten met ^{12}C (dit zijn iets zwakkere bindingen). Het resultaat van biodegradatie is dat het residu (het nog niet gedegreerde toluen) aangerijkt wordt in het zwaardere ^{13}C isotoop). Indien biodegradatie optreedt, zal dit gemeten worden als minder negatieve waarden van de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ verhouding ($\delta^{13}\text{C}$ in ‰). De resultaten van de isotopenmetingen zijn weergegeven in Tabel 4.

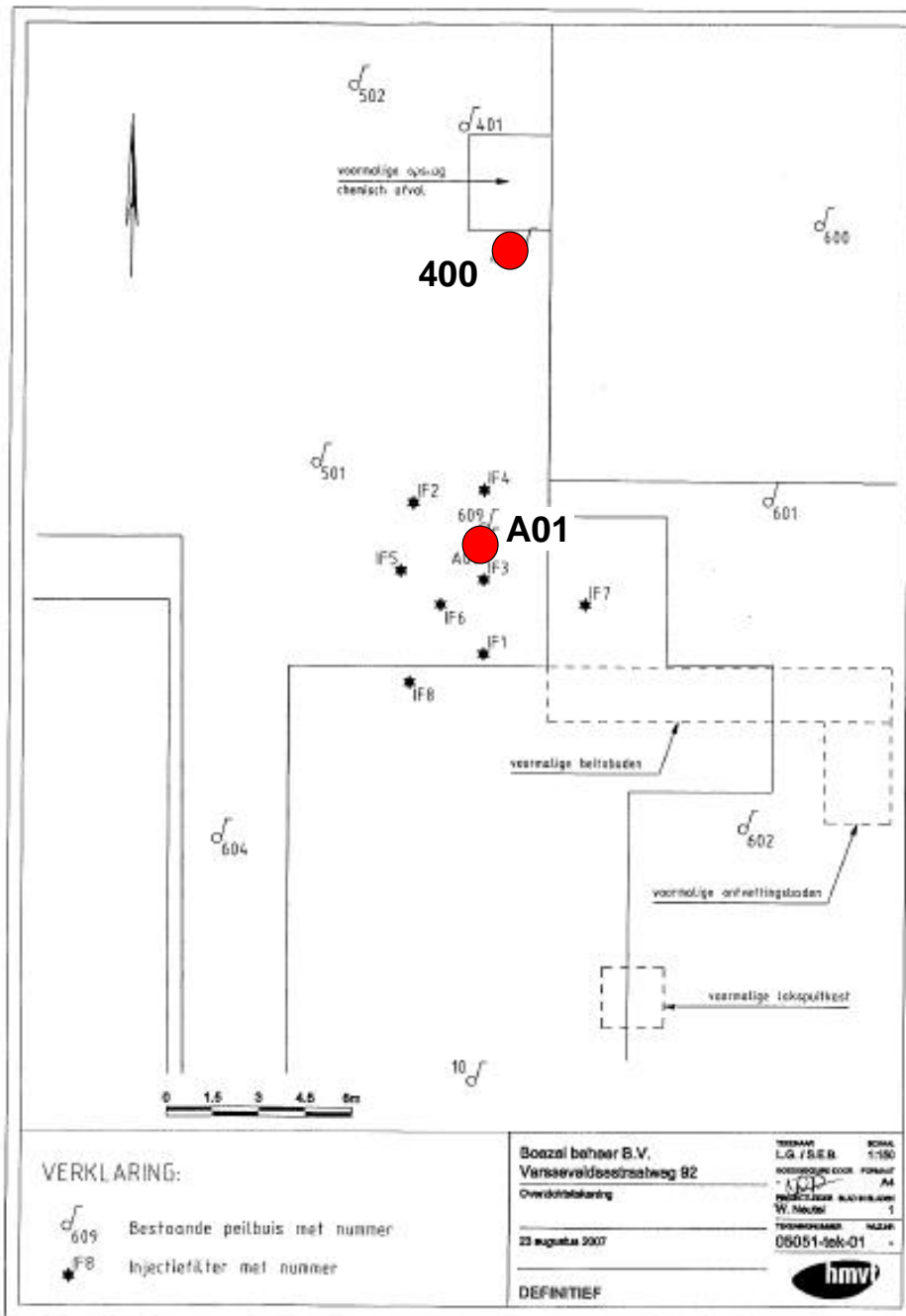
Uit de resultaten blijkt dat er een significant verschil van ongeveer 2‰ is gemeten in de isotopenratio's van het toluen uit de peilbuizen A01 en 501. Dit duidt op biodegradatie van het toluen op de locatie Aalten. De resultaten geven echter niet aan of deze degradatie in het verleden is opgetreden of dat het nu optreedt.

Een nadere uitleg over isotopenmetingen is gegeven in Hoofdstuk 3.

Voor deze locatie zijn 4 Bio-traps gebruikt.

Tabel 4 Resultaten van de koolstof isotopenmetingen van toluen in 4 peilbuizen van locatie Aalten ($\delta^{13}\text{C}$ = verhouding tussen ^{13}C en ^{12}C in ‰; SD = standaard deviatie, N = aantal monsters).

Peilbuis	$\delta^{13}\text{C}$	SD	N	^{13}C Toluene Bio-trap	Standaard Bio-trap
400	-25.27	0.79	2	1	1
IF-1	-25.01	0.15	3		
A01	-24.29	0.41	2	1	1
501	-26.31	0.81	2		
			Totaal	2	2



Figuur 7 Situatieschets van de locatie Aalten met een overzicht van de peilbuizen.

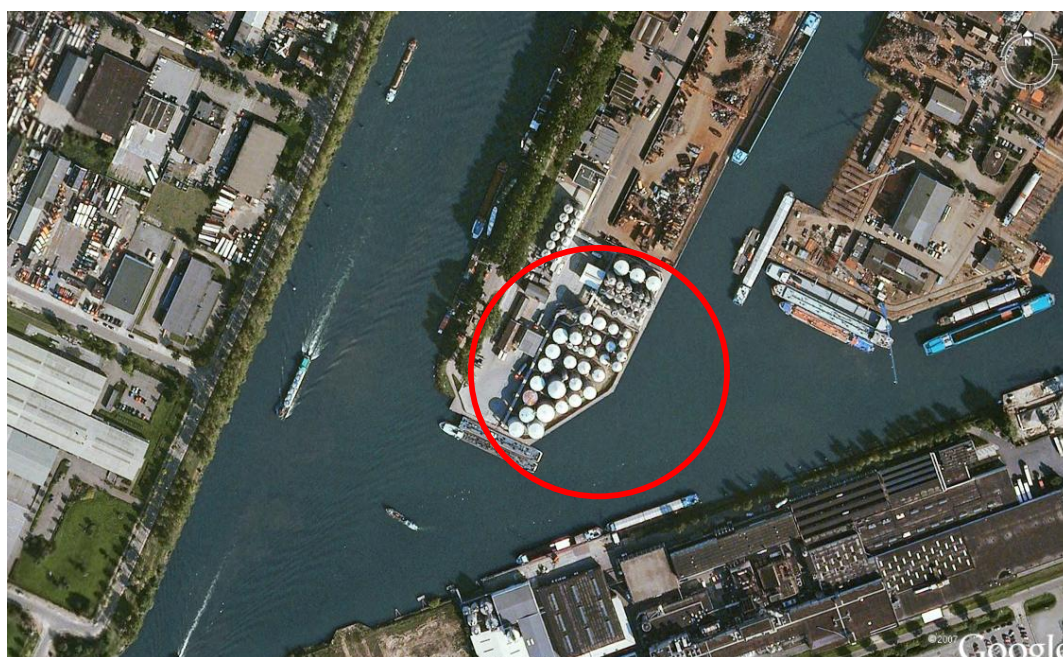
2.4 Locatie Nijmegen

2.4.1 Omschrijving

De locatie Nijmegen aan de Nijverheidsweg bestaat uit een tankopslag (zie Figuur 8). De verontreiniging bestaat uit MtBE.

Uit de historische gegevens (2004 – 2006) blijkt dat de verontreiniging zich vooral op een diepte van 14–18m bevindt, zie ook Figuur 9. Er bevinden zich 10 peilbuizen op het terrein. Een overzicht van de gemeten concentraties is weergegeven in Tabel 5 en Figuur 9.

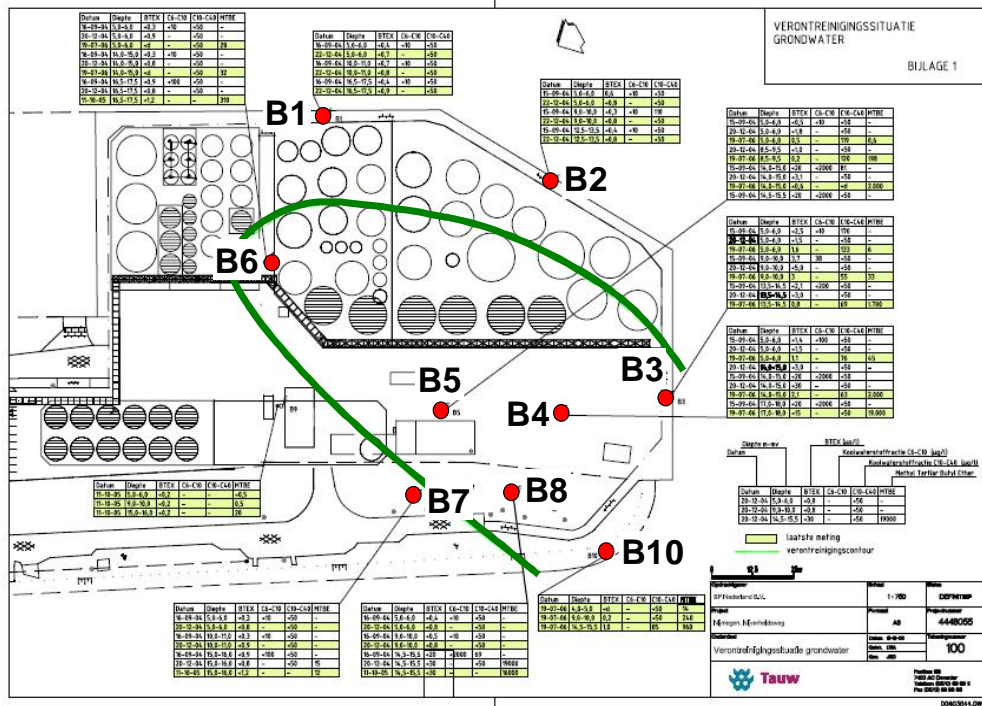
De hoogst gemeten concentratie MtBE is 19.000 µg/L (2006) in peilbuis B4 op een diepte van 17–18m. Deze peilbuis is echter wegens graafwerkzaamheden verdwenen, evenals de peilbuizen B7 en B9.



Figuur 8 Locatie Nijmegen

Tabel 5 Samenvatting van de MtBE verontreiniging op de locatie Nijmegen (concentratie in µg/L). De met rood gemarkeerde peilbuizen zijn verdwenen. De groen gemarkeerde peilbuizen zijn in 2008 in het kader van het huidige project opnieuw bemonsterd en gemeten.

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B10 / PB14
2004	-	-	-	-	-	-	15	19000	-
2005	-	-	-	-	-	310	12	16000	-
2006	-	-	1700	19000	2000	32	-	-	960
2008	125	<10	349	-	31	12	-	-	<10



Figuur 9 Verontreinigingsituatie op de locatie Nijmegen. De MtBE verontreiniging is met een groene contour aangegeven.

In 2008 zijn nieuwe concentratiemetingen uitgevoerd (vóór de start van de Bio-trap test) op 6 peilbuizen. De resultaten van deze meetronde zijn samengevat in Tabel 6. Ten opzichte van de vorige meetronden (zie Tabel 5) is de MtBE concentratie duidelijk afgenomen. Opvallend is dat in peilbuis B1 nu wel MtBE is aangetoond, terwijl dit in de voorgaande meetronden niet het geval was. Een ander belangrijk gegeven is dat in drie peilbuizen (B3, B5 en B6) relatief hoge concentraties TBA (Tertiary Butyl Alcohol) zijn gemeten. TBA is een afbraakproduct van MtBE. TBA kan ook in geringe hoeveelheden in benzine voorkomen, echter de verhouding MtBE / TBA op deze locatie suggereert natuurlijke afbraak van het MtBE.

Tabel 6 Resultaten van de concentratiemetingen (in µg/L) uit 2008.

Peilbuis	MtBE	TBA	TBF
B1	125	<10	<10
B2	<10	<10	<10
B3	349	7798	<10
B5	31	264	<10
B6	12	634	<10
B10 / PB14	<10	<10	<10

2.4.2 Selectie van peilbuizen

Voor het MtBE deel van het demonstratieproject zijn 4 met ^{13}C gelabelde MtBE Bio-traps beschikbaar en 4 standaard Bio-traps. De motivatie voor de selectie van de peilbuizen is gegeven in Tabel 7. De standaard Bio-traps zijn gebruikt om de verdeling van de vetzuren (phospholipid fatty acid analysis, PLFA) te bepalen en voor de DNA analyses. Deze DNA analyses zijn door Envirogene uitgevoerd. De met ^{13}C -MtBE gelabelde Bio-traps zijn gebruikt voor de isotopenmetingen op de vetzuren en voor de DNA analyses. Een nadere uitleg van deze technieken volgt in Hoofdstuk 3.

Tabel 7 Verdeling van de Bio-traps (^{13}C gelabeld en standaard) op de locatie Nijmegen.

Peilbuis	Diepte (m)	^{13}C MtBE Bio-trap	Standaard Bio-trap	Opmerking
B2	13.5 – 14.5	1	1	Referentie. Geselecteerd vanwege het ontbreken van een contaminant (ook in het verleden). Deze peilbuis is geselecteerd voor de bepaling van de achtergrondwaarden.
B3	13.5 – 14.5	2	1	Geselecteerd vanwege de hoogste MtBE en TBA concentraties.
B5	14.0 – 15.0	1	1	Geselecteerd vanwege aanwezigheid van TBA en de sterkste afname in de MtBE concentratie
B6	16.5 – 17.5		1	Geselecteerd vanwege aanwezigheid van TBA. Test om te bepalen of er eventuele vorming van biofilm en dus bacteriegroei plaatsvindt op niet gelabelde Bio-traps
Totaal		4	4	

2.5 Samenvatting locaties

Tabel 8 geeft een overzicht van de 4 locaties m.b.t. het aantal gebruikte Bio-traps. In totaal zijn er voor dit demonstratieproject 31 Bio-traps gebruikt, waarvan er 18 gelabeld waren met benzeen, toluen of MtBE. Als aanvulling op vier locaties is ook nog een ¹³C gelabelde Bio-trap gebruikt in een benzeenreactor in het laboratorium. Deze wordt nader omschreven in paragraaf 4.1.

Tabel 8 Overzicht van de gebruikte Bio-traps per locatie

Locatie	Peilbuis	Diepte (m)	Omschrijving
Froombosch	212050	1.80 - 2.80	¹³ C Benzeen Bio-trap
Froombosch	212050	1.80 - 2.80	¹³ C Benzeen Bio-trap
Froombosch	212050	1.80 - 2.80	Standaard Bio-trap
Froombosch	314082	2.50 - 3.50	¹³ C Benzeen Bio-trap
Froombosch	314082	2.50 - 3.50	¹³ C Benzeen Bio-trap
Froombosch	314082	2.50 - 3.50	Standaard Bio-trap
Froombosch	319983	2.94 - 3.94	¹³ C Benzeen Bio-trap
Froombosch	319983	2.94 - 3.94	Standaard Bio-trap
Bergen	055/012	3.27	¹³ C Benzeen Bio-trap
Bergen	055/012	3.27	Standaard Bio-trap
Bergen	055/012	8.43	¹³ C Benzeen Bio-trap
Bergen	055/012	15.30	¹³ C Benzeen Bio-trap
Bergen	055/012	15.30	Standaard Bio-trap
Bergen	055/207	4.00	¹³ C Benzeen Bio-trap
Bergen	055/207	9.00	¹³ C Benzeen Bio-trap
Bergen	055/207	9.00	Standaard Bio-trap
Bergen	055/020	3.30	¹³ C Benzeen Bio-trap
Bergen	055/020	3.30	Standaard Bio-trap
Aalten	A01	3.25	¹³ C Toluene Bio-trap
Aalten	A01	3.25	Standaard Bio-trap
Aalten	400		¹³ C Toluene Bio-trap
Aalten	400		Standaard Bio-trap
Nijmegen	B2	13.5 - 14.5	¹³ C MtBE Bio-trap
Nijmegen	B2	13.5 - 14.5	Standaard Bio-trap
Nijmegen	B3	13.5 - 14.5	¹³ C MtBE Bio-trap
Nijmegen	B3	13.5 - 14.5	¹³ C MtBE Bio-trap
Nijmegen	B3	13.5 - 14.5	Standaard Bio-trap
Nijmegen	B5	14.0 - 15.0	¹³ C MtBE Bio-trap
Nijmegen	B5	14.0 - 15.0	Standaard Bio-trap
Nijmegen	B6	16.5 - 17.5	Standaard Bio-trap
Benzeenreactor			¹³ C Benzeen Bio-trap

3 Toegepaste analysetechnieken

In dit project zijn verschillende analysetechnieken toegepast om aan te kunnen tonen of de Bio-trap techniek daadwerkelijk geschikt is om natuurlijke afbraak op verschillende locaties te kunnen aantonen. In dit hoofdstuk wordt een korte uitleg gegeven van de gebruikte technieken.

3.1 Bio-traps en labeling

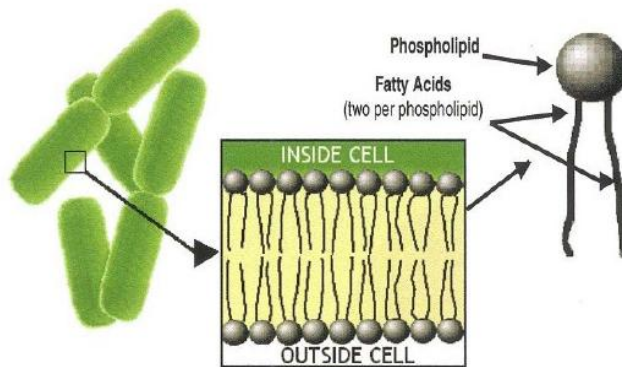
Een omschrijving van het Bio-trap concept is gegeven In Hoofdstuk 1. In dit demonstratieproject zijn twee verschillende typen Bio-traps gebruikt. Echter, het enige verschil tussen de twee typen Bio-traps is het feit dat van een aantal Bio-traps de Bio-sep beads (korrels) zijn geladen met ¹³C gelabelde contaminant (Benzeen, Tolueen of MtBE), verder zijn beide Bio-traps identiek. De standaard (niet gelabelde) Bio-trap kan gezien worden als een 'passive sampler'.

De Bio-traps zijn geprepareerd door Microbial Insights (V.S.) en via Envirogene (U.K.) geleverd aan Deltares/TNO. De techniek voor het labelen van de korrels is beschreven in o.a. Geyer et al. (2005). De concentratie van het benzeen is 1.406 (+/- 0.105) mg per korrel, waarbij 10.9% bestaat uit ¹³C gelabeld benzeen. Voor tolueen zijn de waarden gelijk. De concentratie van MtBE is 0.89 (+/- 0.04) mg per korrel, waarbij 10.6% bestaat uit ¹³C gelabeld MtBE. Een Bio-trap bevat ongeveer 200 korrels.

3.2 Phospholipid Fatty Acid analyses (PLFA)

Fosfolipiden zijn essentiële membraancomponenten van levende cellen en maken deel uit van de biomassa van organismen. De vetzuren geven inzicht in de samenstelling van microbiële gemeenschappen. Bacteriën, Archaea en schimmels vormen de microbiële biomassa in de bodem, die verantwoordelijk is voor de (eventuele) afbraak van contaminanten.

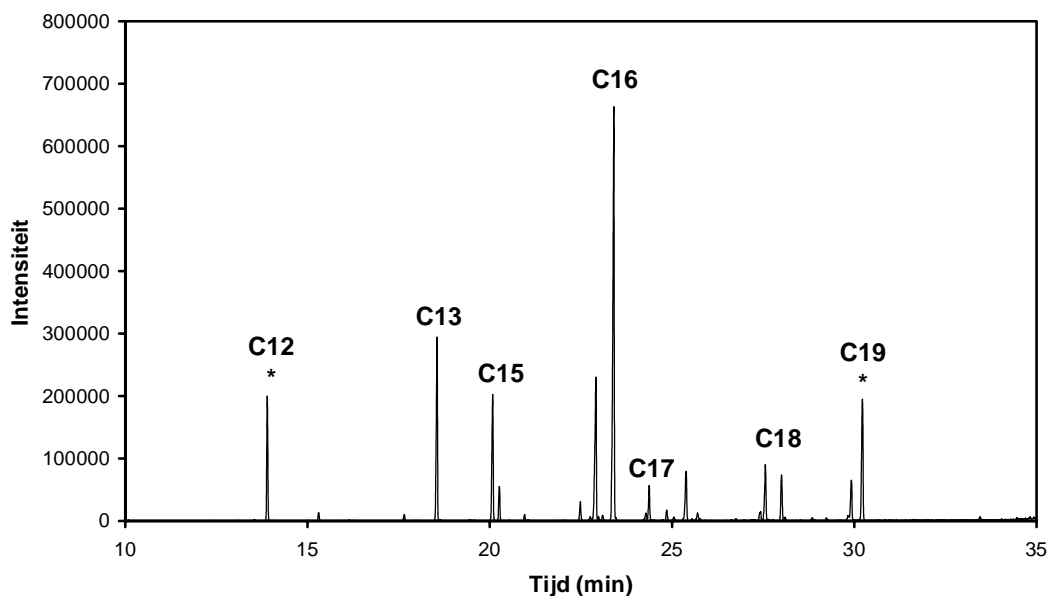
Fosfolipiden zijn vetten (triglyceriden). Vetten bestaan uit een glycerolmolecuul waar drie vetzuren aan vastzitten. Fosfolipiden hebben aan het glycerolmolecuul slechts twee vetzuren, terwijl het derde vetzuur vervangen is door een fosfaatgroep. De vetzuren in een fosfolipide zijn hydrofoob en keren zich van het water af. De fosfaatgroep in een fosfolipide is daarentegen hydrofiel. Wanneer fosfolipiden in een waterige omgeving komen, zullen de apolaire ketens (vetzuren) vanwege hun hydrofobe karakter elkaar aantrekken. De fosfaatgroepen zullen zich keren naar het water toe. Op die manier ontstaat de typische fosfolipide-tweelaags-structuur (zie Figuur 10)



Figuur 10 Opbouw van een celmembraan met fosfolipiden (bron: http://www.epa.gov/oem/docs/oil/fss/fss06/sublette_1.pdf)

De PLFA-analyse is gebaseerd op Solid Phase Extraction (SPE). SPE is een beproefde methode om lipiden effectief te scheiden. Deze methode heeft kleine hoeveelheden oplosmiddel nodig en vertoont een goede selectiviteit voor lipiden. De lipiden worden met deze techniek gescheiden in verschillende fracties: neutrale lipiden, glycolipiden en fosfolipiden. Neutrale en glycolipiden worden verder niet gebruikt in de vervolganalyse (isotopenanalyse). De fosfolipiden worden gemethyleerd tot FAME's (Fatty Acid Methyl Esters). Daarna kunnen de FAME's geanalyseerd worden met een gaschromatograaf. Een voorbeeld van een chromatogram van een PLFA extract van een Bio-trap is gegeven in Figuur 11. Van de individuele vetzuren is met behulp van de gaschromatograaf, gekoppeld aan een isotopenratio massaspectrometer (GC-IRMS), de stabiele koolstof-isotopenratio bepaald ($\delta^{13}\text{C}$). Omdat bij een aantal Bio-traps ^{13}C is gebruikt, is dit terug te vinden in de vetzuren van de bacteriën die op en in de korrels hebben geleefd, doordat bacteriën die het ^{13}C gelabelde substraat opnemen dat ^{13}C onder andere ook inbouwen in hun PFLA. Daardoor zal het PFLA van deze bacteriën een relatief veel hogere hoeveelheid (ratio) ^{13}C bevatten dan bacteriën die andere koolstofbronnen consumeren. Voor dit project zijn de individuele vetzuren niet geïdentificeerd of gekwantificeerd en is alleen bepaald wat de ketenlengte is.

Na een verblijftijd van 6-8 weken in een peilbuis zijn de Bio-traps verzameld voor de PLFA analyse in het laboratorium. Ongeveer de helft van de hoeveelheid Bio-sep beads is voor deze extractie gebruikt de andere helft is voor DNA analyse opgestuurd naar Envirogene.



Figuur 11 Voorbeeld van een chromatogram van de fosfolipiden (FAME's) zoals geëxtraheerd via de PLFA analyses

3.3 Componentspecifieke stabiele isotopen analyse (CSIA)

Componentspecifieke stabiele isotopen analyse (CSIA) wordt uitgevoerd op een gaschromatograaf (GC) gekoppeld aan een isotopenratio massaspectrometer (IRMS). Met deze techniek wordt de relatieve hoeveelheid van twee stabiele isotopen gemeten. In het geval van koolstof wordt de ratio tussen ^{13}C en ^{12}C bepaald ten opzichte van een internationale standaard (V-PDB of Vienna Peedee Belemniet).

De gemeten waarden worden gerapporteerd als $\delta^{13}\text{C}$:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{sample}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}} \right] \times 1000$$

Omdat de uiteindelijke δ -waarden zeer klein zijn, worden ze over het algemeen vermenigvuldigd met 1000 en gerapporteerd als 'delen per duizend' (permil of ‰)

In het huidige project is de techniek vooral gebruikt voor de meting van de isotopenratio van de geëxtraheerde vetzuren (PLFA analyse) om te bepalen of ^{13}C was ingebouwd in de biomassa. Incorporatie van ^{13}C van bijvoorbeeld het benzeen zal de isotopenwaarde van de vetzuren naar veel zwaardere waarden doen verschuiven (minder negatieve waarden). Tevens zijn een aantal isotopenmetingen uitgevoerd op contaminanten uit het grondwater van de locaties (benzeen, toluen en MtBE).

3.4 DNA analyse (qPCR)

Op het uit de Bio-Sep beads geëxtraheerde microbiële DNA is een kwantitatieve PCR (qPCR) uitgevoerd. PCR staat voor Polymerase Ketting Reactie (Polymerase Chain Reaction). Deze techniek wordt onder andere gebruikt om kleine hoeveelheden van een specifiek stuk DNA een groot aantal keren te vermeerderen. De PCR-reactie bestaat uit drie verschillende fasen.

De eerste stap is een temperatuursverhoging waardoor het DNA denatureert. Dat wil zeggen dat de waterstofbruggen tussen de DNA-strengen worden verbroken. Daardoor valt de dubbele helix van het DNA uit elkaar tot enkelstrengs DNA. Aan het PCR reactiemengsel zijn twee primers en de bouwstenen van DNA (C, A, G en T) toegevoegd. De primers zijn kleine stukjes chemisch gesynthetiseerd DNA, waarvan de basenvolgorde (volgorde van de bouwstenen C, A, G en T) complementair is met die van de uiteinden van het te vermeerderen DNA fragment. De samenstelling van de primers is afgestemd op het DNA fragment waarin men geïnteresseerd is. Dus de samenstelling van de primers bepaald ook welk DNA fragment men kan vermenigvuldigen in de PCR reactie. Na een verlaging van de temperatuur binden deze primers aan het enkelstrengs DNA en zorgen ze er voor dat hieraan weer nieuwe basen gekoppeld kunnen worden. Dit gebeurt onder invloed van het enzym polymerase.

Dit is de laatste fase van de PCR-reactie. Polymerase zorgt er voor dat de primers verder worden verlengd tot een compleet stuk DNA, door de toegevoegde losse DNA-bouwstenen op de juiste plaats aan elkaar te koppelen. Tegen beide gesplitste strengen ontstaat zo een nieuwe streng van DNA en zo wordt de hoeveelheid DNA verdubbeld. Door de stappen meerdere malen te herhalen, wordt een specifiek stuk DNA zeer vaak vermenigvuldigd. Een goed overzicht van de PCR techniek wordt gegeven door Zhang & Fang (2006).

De qPCR analyse is een vorm van PCR waarbij men online in staat is de voortgang van de PCR reactie te meten (het hoeveelheid product gevormd) en dit geeft uiteindelijk het aantal genkopieën per Bio-Sep bead.

Voor het kwantificeren van de totale bacterie populatie zijn de zgn. qEuBac primers toegepast. Deze primer is gebruikt om bacteriele 16S rRNA genen te vermenigvuldigen, deze genen zijn aanwezig in alle bacteriën en het is mogelijk om primers te ontwikkelen en te gebruiken die het gen in vrijwel alle bacteriën herkennen en kunnen vermenigvuldigen. Deze test geeft een indicatie voor de totale hoeveelheid Eubacteriën per Biosep bead.

In dit project werden via qPCR de aanwezigheid en kwantiteit bepaald van 4 catabole genen die coderen voor de enzymen betrokken bij 4 verschillende afbraakprocessen. Een overzicht van de primer sets is gegeven in Tabel 9.

Tabel 9 Overzicht van de gebruikte primer sets voor de qPCR analyse

Primer set	Enzym	Proces
sgTOLD	tolueen-dioxygenase.	Aerobe afbraak benzeen, tolueen, ethylbenzeen, xyleen (BTEX)
sgHCM	hydroxyisobutyryl-CoA mutase	Aerobe afbraak van MtBE
NAH	naftaleen-dioxygenase	Aerobe afbraak naftaleen, 1- en 2-methylnaftalenen, anthraceen, fluoreen en ethylbenzeen
bssA	benzyl succinate synthase	Anaerobe afbraak van tolueen

De hier gegeven omschrijving van de gebruikte primer sets is gebaseerd op een ETV Promote rapport over de verificatie van Bio-traps als passive samplers (Bastiaens & Gemoets, 2008). Verdere details over deze primer sets zijn niet bekend aangezien dit vertrouwelijke informatie is (Bastiaens & Gemoets, 2008). Dit bemoeilijkt een eenduidige interpretatie. Zo zijn er bijvoorbeeld 109 verschillende degradatiereacties bekend voor BTEX en zijn er momenteel 10 verschillende tolueen-dioxygenases bekend (zie www.umbbd.msi.umn.edu). Omdat dus niet bekend is welke primers in de primer sets zijn gebruikt is een eenduidige interpretatie van de DNA analyses niet mogelijk, omdat niet duidelijk is welke routes voor welke bacteriën met die primers herkend kunnen worden. De resultaten van de DNA analyses worden besproken in Hoofdstuk 5.

Een verdere toelichting op de DNA analyses wordt door Envirogene als volgt gegeven:

“The assays are designed by comparing gene sequences known to be involved in various degradative pathways. They are aligned and a conserved region is identified (if present). If a conserved region is not present, we do a phylogenetic analysis followed by a clustalW alignment, with a subsequent sorting of the sequences in CLADS. The assays are then designed to target various CLADS. We don't claim our assays will 100% identify the organisms capable of degrading a given pollutant, but our experience, together with the 5 year experience of MI in the States, we can correlate that if we find e.g. TOLD we can be confident that there is an activity correlated with the presence of that gene, so we can conclude that the gene is actively involved in the breakdown of hydrocarbons.”



4 Component Specifieke Isotopen Analyses

In dit hoofdstuk zullen de resultaten van de Bio-trap testen per locatie worden besproken. Per locatie zal een conclusie worden gegeven m.b.t. het eventuele optreden van natuurlijke afbraak.

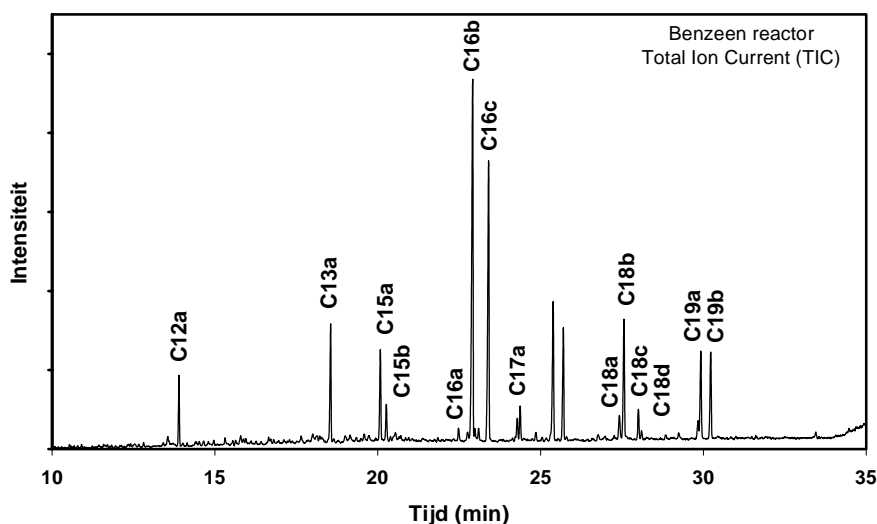
4.1 Benzeenreactor

De resultaten van de Bio-trap uit de reactor waarin benzeen onder anaerobe omstandigheden wordt omgezet worden als referentie gebruikt omdat voor de reactor via andersoortige analyses (o.a. monitoring van concentraties) al is aangetoond dat daadwerkelijk anaerobe afbraak van benzeen plaatsvindt (Langenhoff et al., 2004). Het gaschromatogram van het PLFA extract van de Bio-trap is weergegeven in Figuur 12. De C12a en C19b componenten zijn de in het laboratorium aan het analysemonster toegevoegde standaarden.

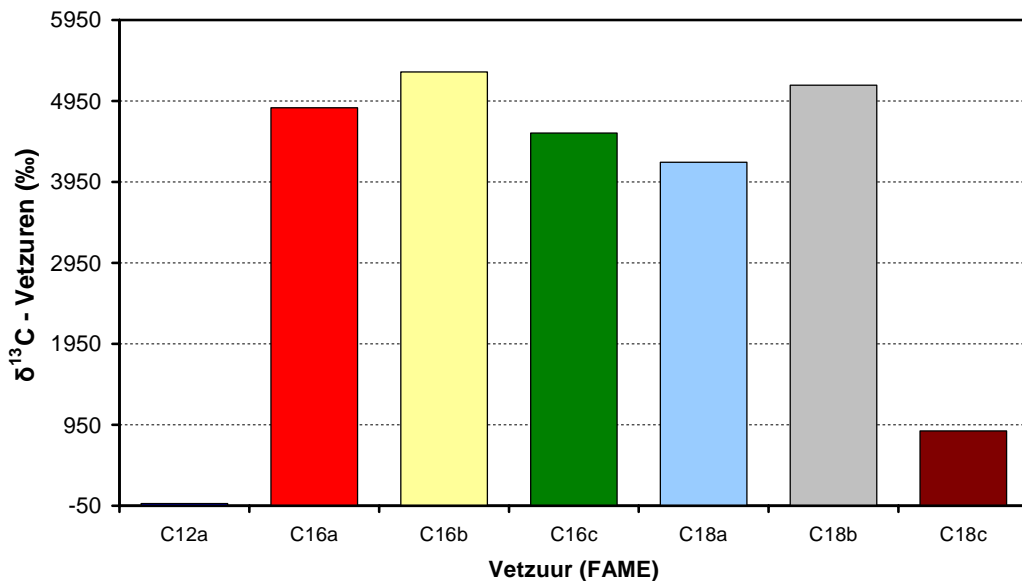
De overige nummers vertegenwoordigen één of meerdere vetzuren in het C12 – C19 bereik.

In Figuur 13 zijn de resultaten weergegeven van de isotopen-metingen op zeven vetzuren. De uitgangswaarden voor de vetzuren, zonder inbouw van ^{13}C , is ongeveer -33‰ tot -29‰ . Hogere isotopenwaarden (minder negatief) duiden op inbouw van ^{13}C in de vetzuren. Uit Figuur 13 blijkt dat voor alle vetzuren er een duidelijke inbouw van ^{13}C heeft plaatsgevonden. De $\delta^{13}\text{C}$ waarden van sommige vetzuren is meer dan 5000‰ . De enige bron van ^{13}C is het ^{13}C gelabelde benzeen van de Bio-Trap, zodat de inbouw van het ^{13}C in de vetzuren gekoppeld is aan de omzetting van het benzeen. Deze Bio-trap was gebruikt als referentie en de resultaten laten zien dat deze inderdaad als positieve controle werkt.

Dit is een overtuigend bewijs dat in de reactor benzeen wordt afgebroken.



Figuur 12 Gaschromatogram van het PLFA extract (fosfolipiden) van de Bio-trap uit de benzeenreactor. De C12a en C19b componenten zijn de in het laboratorium toegevoegde standaarden.



Figuur 13 Koolstofisotopenratio van een aantal vetzuren (fosfolipiden) uit de Bio-trap afkomstig van de benzeenreactor

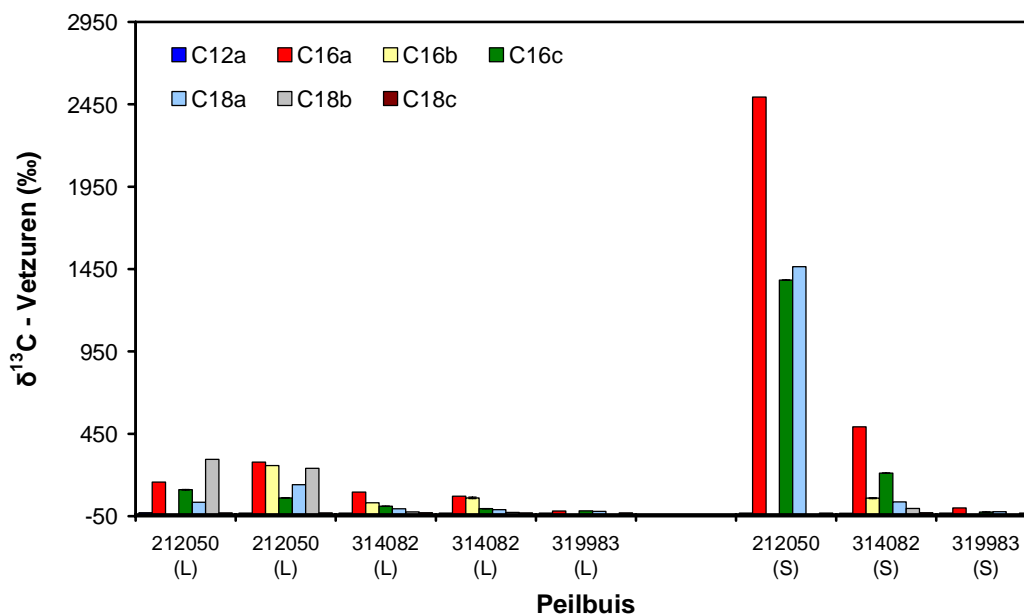
4.2 Froombosch

Voor deze locatie zijn in totaal 8 Bio-traps gebruikt, waarvan 5 Bio-traps ¹³C gelabeld benzeen bevatten en de overige 3 Bio-traps geen benzeen bevatten. Deze zijn in drie peilbuizen geplaatst. De resultaten van de isotopenanalyses op de PLFA extracten zijn weergegeven in Figuur 14. In een aantal Bio-traps is een zeer duidelijke aanrijking van ¹³C in de vetzuren. De hoogste gemeten waarde is bijna 2500‰, gemeten op een C16 vetzuur uit de standaard Bio-trap van peilbuis 212050.

Opvallend is dat de aanrijking in beide gelabelde Bio-traps in deze peilbuis veel geringer is. Dit geldt ook voor peilbuis 314082, waarbij de vetzuren uit standaard Bio-trap ook sterker zijn aangerijkt dan in de gelabelde Bio-traps. In peilbuis 319983 is slechts een kleine aanrijking van minder dan 15% waarneembaar in de vetzuren van de gelabelde Bio-trap.

Er heeft hier een omwisseling van de gelabelde en standaard Bio-traps plaatsgevonden.

Uitgaande van een verwisseling is de belangrijkste conclusie dat op deze locatie natuurlijke afbraak plaatsvindt van benzeen.



Figuur 14 Resultaten van de isotopenmetingen op de vetzuren uit de Bio-traps van locatie Froombosch. Peilbuizen aangeduid met (L) geven de resultaten van de met ¹³C gelabelde Bio-trap. Peilbuizen aangeduid met (S) geven de resultaten van een blanco (standaard) Bio-trap.

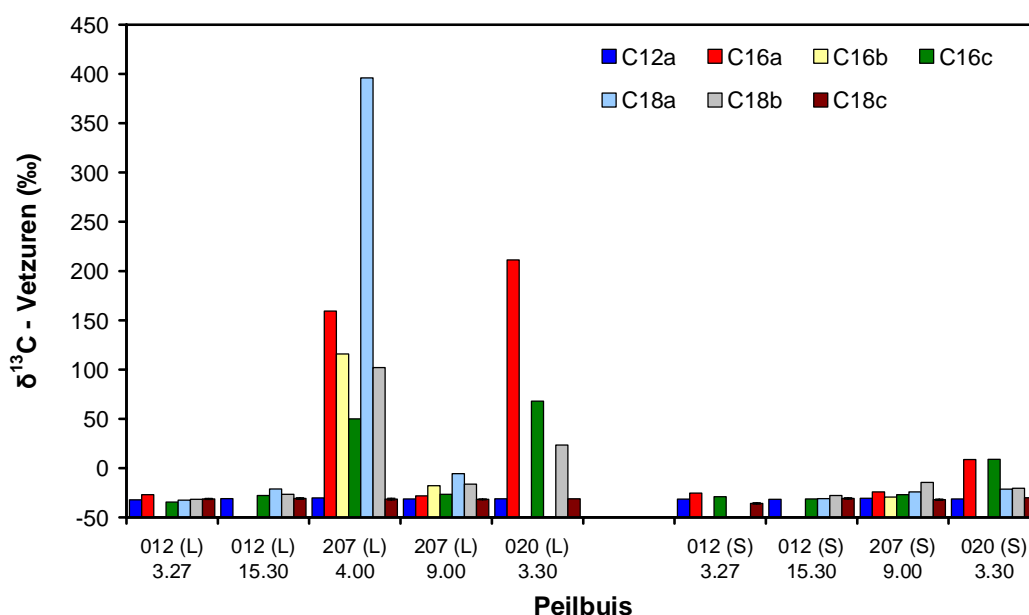
4.3 Bergen

Voor de locatie Bergen zijn 10 Bio-traps gebruikt, deze zijn in drie peilbuizen op verschillende dieptes gehangen. De resultaten van de isotopenmetingen op de PLFA extracten zijn grafisch weergegeven in Figuur 15. Voor de vetzuren uit twee ^{13}C gelabelde Bio-traps is een duidelijke aanrijking te meten. Dit zijn twee Bio-traps die gehangen zijn op resp. 4 en ongeveer 3 meter diepte. Vetzuren van Bio-traps uit dezelfde peilbuizen maar afkomstig van grotere dieptes vertonen een veel geringere tot geen aanrijking.

Conclusie is dat er in de ondiepe delen van het grondwater ter plaatse van de peilbuizen 207 en 020 natuurlijke afbraak plaatsvindt van benzeen.

Deze uitkomsten bevestigen de hypothese dat er ter hoogte van de oude vuilstort wel afbraak optreedt, maar dat dit niet het geval is onder de vuilstort.

Opvallend is dat er duidelijke afbraak plaatsvindt in peilbuis 020 terwijl deze peilbuis buiten het stortcompartiment ligt en de concentraties van benzeen beneden de detectielimiet liggen. Uit de resultaten van peilbuis 012 blijkt dat hier op geen enkele diepte afbraak van benzeen plaatsvindt.

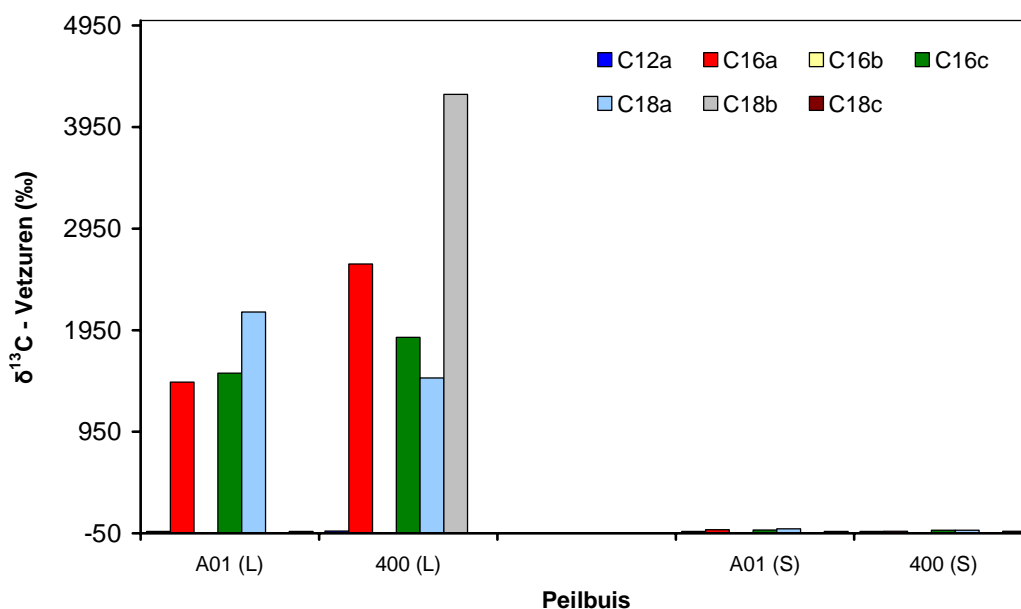


Figuur 15 Resultaten van de isotopenmetingen op de vetzuren uit de Bio-traps van locatie Bergen. Peilbuizen aangeduid met (L) geven de resultaten van de met ^{13}C gelabelde Bio-trap. Peilbuizen aangeduid met (S) geven de resultaten van een blanco Bio-trap.

4.4 Aalten

Voor de locatie Aalten zijn 4 Bio-traps gebruikt, waarvan twee gelabeld waren met ^{13}C tolueen. De Bio-traps zijn gehangen in twee verschillende peilbuizen. Er treed een duidelijke aanrijking van ^{13}C op in de vetzuren van de twee gelabelde Bio-traps. De hoogste isotopenwaarde bedraagt iets meer dan 4200‰ in het C18 vetzuur afkomstig uit de Bio-trap van peilbuis 400. De duidelijke verschillen tussen de standaard en de gelabelde Bio-trap geven aan dat hier geen uitwisseling van gelabelde component heeft plaatsgevonden.

De resultaten geven een duidelijke afbraak van tolueen aan in beide peilbuizen



Figuur 16 Resultaten van de isotopenmetingen op de vetzuren uit de Bio-traps van locatie Aalten. Peilbuizen aangeduid met (L) geven de resultaten van de met ^{13}C gelabelde Bio-trap. Peilbuizen aangeduid met (S) geven de resultaten van een standaard (blanco) Bio-trap.

4.5 Nijmegen

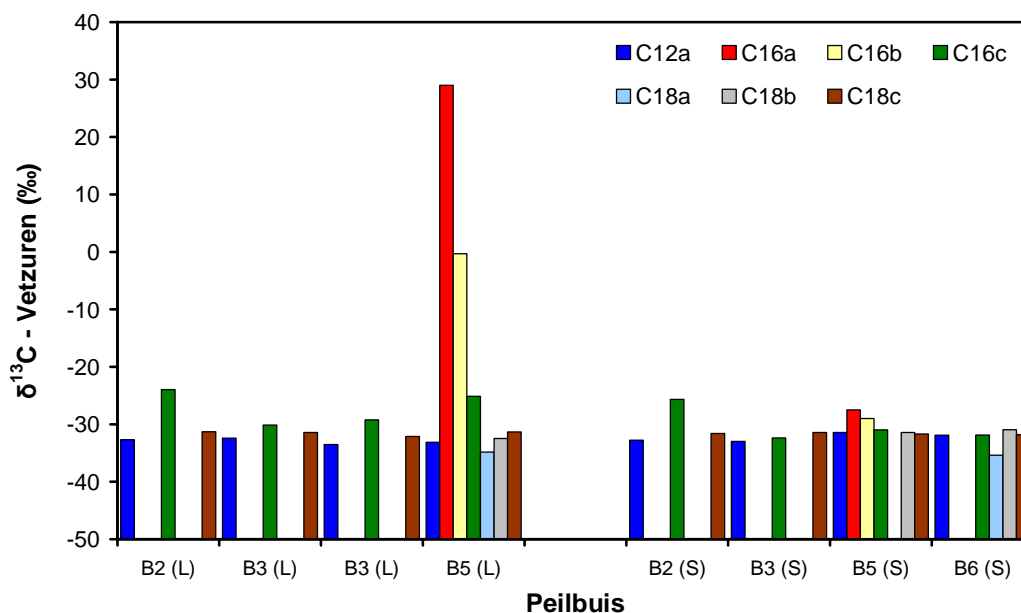
Voor locatie Nijmegen zijn in totaal 8 Bio-traps in 4 verschillende peilbuizen gehangen. Vier van deze Bio-traps bevatten ^{13}C gelabeld MtBE. De resultaten van de isotopenmetingen zijn grafisch weergegeven in Figuur 17. De hoogste isotopenwaarde is gemeten op een C16 vetzuur van peilbuis B5. Met uitzondering van peilbuis B5 zijn er in de overige peilbuizen ook maar 2 'meetbare' vetzuren aanwezig. Opvallend is dat de aanrijking in peilbuis B3 zeer gering tot afwezig is. Deze peilbuis bevat de hoogste MtBE en TBA concentraties van de gehele locatie.

De reden om peilbuis B5 te selecteren was vanwege het feit dat de concentratie MtBE in een periode van 2 jaar sterk was afgenomen, terwijl ook hier TBA aanwezig was. Dit was een indicatie voor mogelijke afbraak van MtBE.

Hoewel de ^{13}C aanrijking in peilbuis B5 niet zo sterk is (in vergelijking met andere substraten en andere locaties) kan duidelijk aangetoond worden dat hier afbraak van MtBE plaatsvindt. Dit is niet het geval voor peilbuis B3, hoewel dit wel verwacht werd op basis van andersoortige analyses.

Uit de verschillen in resultaten tussen de peilbuizen B5 en B3 kan geconcludeerd worden dat de resultaten van één peilbuis niet zondermeer geëxtrapoleerd kunnen worden naar de gehele locatie.

Een mogelijke oorzaak kan zijn dat deze locatie niet homogeen is met betrekking tot afbraakcondities. Een andere (alternatieve) conclusie is dat je voor MtBE langere incubaties nodig hebt om een duidelijk signaal waar te nemen. Het zou dus mogelijk kunnen zijn dat als je bijvoorbeeld een halfjaar incubeert je ook bij de andere peilbuizen de degradatie/inbouw in de PLFAs waarneemt.



Figuur 17 Resultaten van de isotopenmetingen op de vetzuren uit de Bio-traps van locatie Nijmegen. Peilbuizen aangeduid met (L) geven de resultaten van de met ^{13}C gelabelde Bio-trap. Peilbuizen aangeduid met (S) geven de resultaten van een blanco Bio-trap.

Vóór de start en ná beëindiging van de Bio-trap test zijn op de locatie stabiele isotopenmetingen uitgevoerd op het MtBE in het grondwater. De resultaten staan weergegeven in Figuur 18. Uit deze metingen blijkt dat de isotopenratio van het MtBE in het grondwater van drie peilbuizen zeer sterk is toegenomen nadat de Bio-traps verwijderd waren. De hoogste waarde is bijna 9300‰. In deze drie peilbuizen hebben ^{13}C MtBE gelabelde Bio-traps gehangen. Het is duidelijk dat deze Bio-traps ^{13}C MtBE hebben afgegeven aan het grondwater. Op deze grondwatermonsters zijn ook concentratiemetingen uitgevoerd, zie Figuur 19. Het blijkt dat de concentratie van het MtBE in de testperiode is toegenomen.

In de peilbuizen B2, B3 en B5 is de concentratie van het MtBE gestegen met respectievelijk 12, 207 en 231 $\mu\text{g/L}$.

Een Bio-trap bevat ongeveer 178 mg MtBE (gemiddeld 200 korrels per Bio-trap met een concentratie van ongeveer 0.89 mg MtBE per korrel). Uit de literatuur blijkt dat een Bio-trap 20% tot 40% van het MtBE verliest aan het grondwater in een periode van 30 dagen (Busch-Harris, 2008). Per Bio-trap kan er dus 36 mg tot 72 mg MtBE worden afgegeven aan het grondwater. Het volume van de peilbuizen op de locatie Nijmegen is ongeveer 70 liter. De MtBE afgifte van de Bio-traps zou dus kunnen zorgen voor een verhoging van de concentratie met ongeveer 500 $\mu\text{g/L}$ tot 1000 $\mu\text{g/L}$. In peilbuis B3 zijn twee gelabelde Bio-traps gebruikt, waardoor de concentratieverhoging dus zelfs 1000 tot 2000 $\mu\text{g/L}$ zou kunnen zijn.

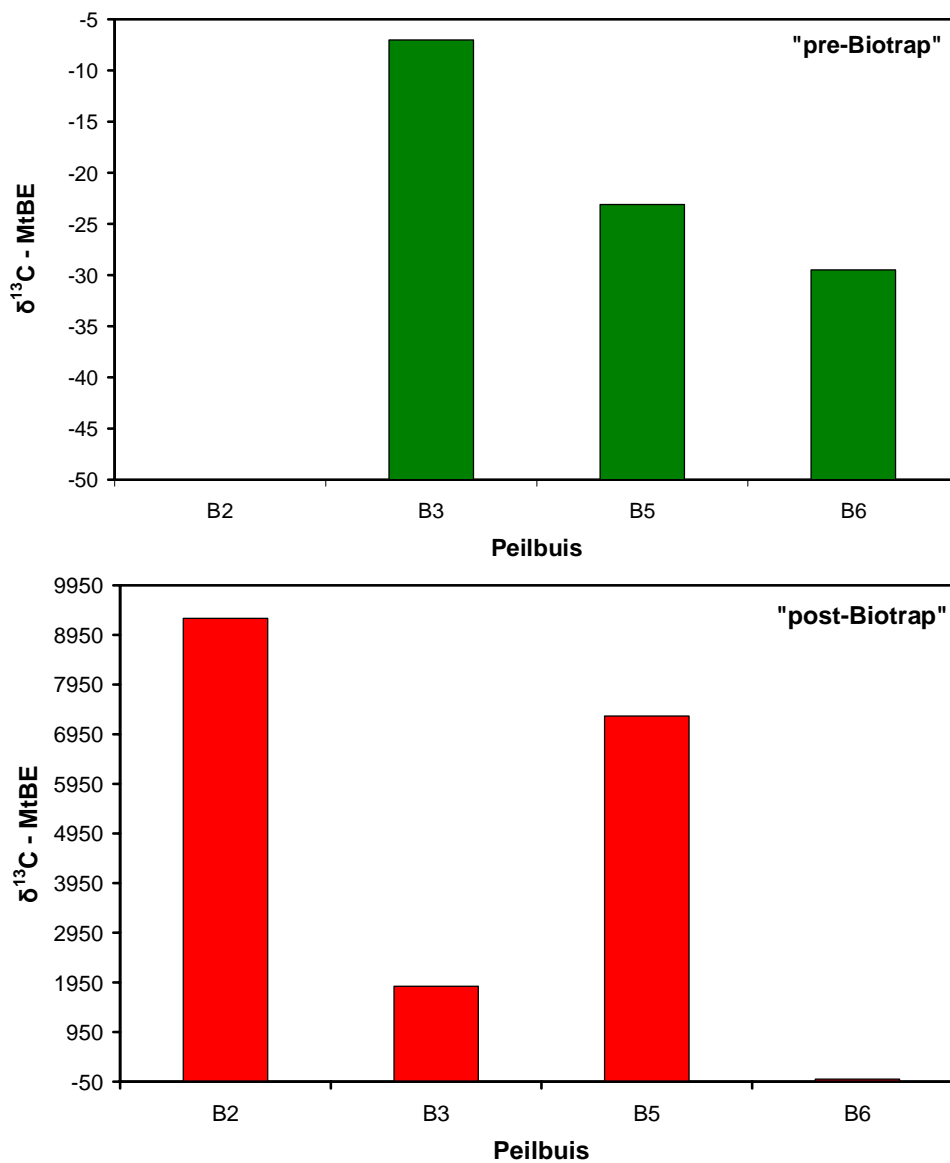
Als aangenomen mag worden dat de MtBE afgifte van elke Bio-trap ongeveer gelijk is dan zijn er nog andere factoren die de huidige verhoging

in het grondwater hebben veroorzaakt. De gemeten concentratieverhoging is in verhouding gering met wat uit de literatuur verwacht kan worden. Dit kan betekenen dat de Bio-traps duidelijk minder MtBE hebben afgegeven of dat het MtBE in deze peilbuizen is gedegraded of dat er verversing van het grondwater is opgetreden (verdunding). Bij de analyses zijn ook de concentraties TBA en TBF gemeten (afbraakproducten van MtBE). Opvallend is dat de concentratie van het TBA in de peilbuizen B3 en B5 gelijk is gebleven of gedaald. De concentratie van het TBA in peilbuis B6 is sterk toegenomen van 634 µg/L naar 1062 µg/L, terwijl het MtBE gehalte gelijk is gebleven. In deze peilbuis is uitsluitend een standaard Bio-trap gehangen. In geen enkele peilbuis is TBF aangetroffen.

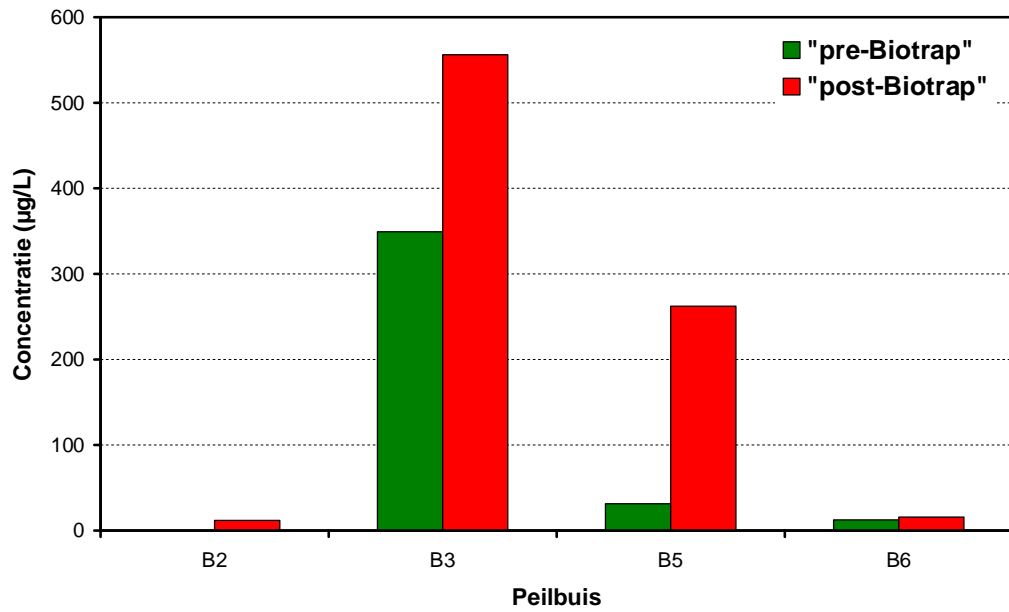
Het is mogelijk dat er in de periode van 8 weken tussen de twee bemonsteringen een significante hoeveelheid van het MtBE dat is afgegeven door de Bio-traps in de peilbuizen B3 en B5 is gedegraded. Dit moet dan echter een proces zijn geweest waarbij geen vorming van TBA heeft plaatsgevonden.

In peilbuis B3 kan geen eenduidige afbraak van MtBE worden aangetoond via de Bio-trap techniek. Op basis van de isotopenwaarde van het MtBE in het grondwater (ongeveer -7.0 ‰) en de hoge concentratie TBA in deze peilbuis was de verwachting dat hier duidelijk aantoonbare afbraak plaatsvindt. Er is een duidelijk verschil in de Bio-trap resultaten van de peilbuizen B3 en B5. De mogelijke oorzaken van deze verschillen zullen nader onderzocht moeten worden.

Uit de concentratiemetingen en isotopenmetingen blijkt dat gelabelde Bio-traps MtBE afgeven aan het grondwater. Isotopenmetingen aan deze component in het grondwater met het doel om eventuele fractionering te bepalen die is ontstaan als gevolg van afbraak is na gebruik van gelabelde Bio-traps niet zinvol.



Figuur 18 Resultaten van de stabiele isotopenmetingen op het MtBE uit de grondwatermonsters van locatie Nijmegen. Bemonstering heeft plaatsgevonden vóór en ná de uitvoering van de Bio-trap test.

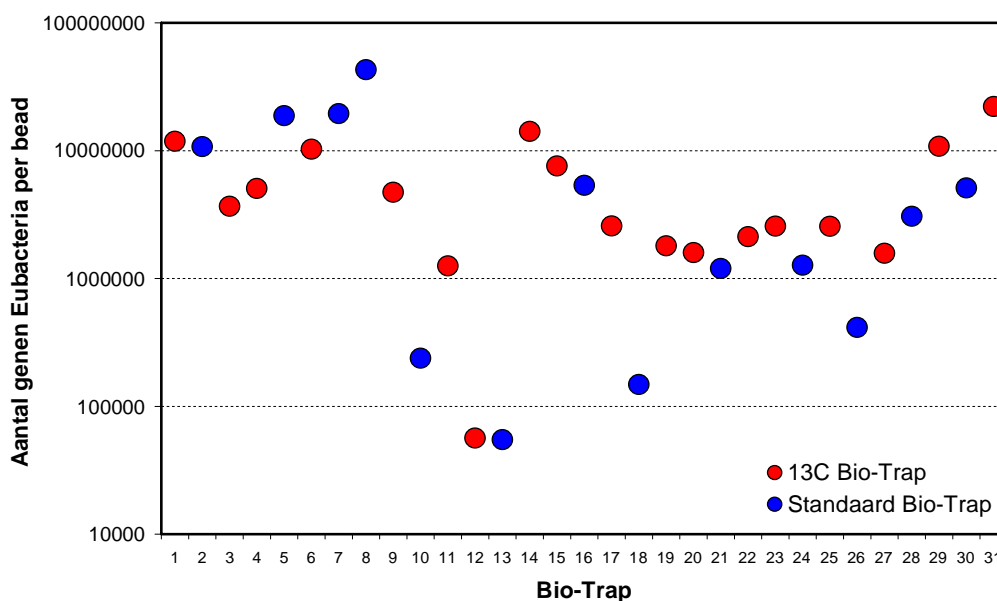


Figuur 19 Resultaten van de MtBE concentratiemetingen van grondwatermonsters van locatie Nijmegen. De bemonstering heeft plaatsgevonden vóór en ná de uitvoering van de Bio-trap test

5 DNA Analyses

5.1 Eubacteriën

Op alle Bio-traps zijn DNA analyses uitgevoerd met behulp van de PCR techniek. De totale hoeveelheid 16SrRNA genkopiën van Eubacteriën per bead is weergegeven in Tabel 10 en Figuur 20. Uit deze figuur blijkt dat er in de Bio-trap van peilbuis B6 (nummer 8 in Figuur 20, locatie Nijmegen) de grootste hoeveelheid bacteriën aanwezig is. Deze peilbuis is juist geselecteerd om te bepalen of er vorming van biofilm plaatsvindt op een niet-gelabelde Bio-trap (standaard Bio-trap). Ook op de Bio-trap uit de benzeenreactor komt een relatief grote hoeveelheid Eubacteriën voor (nummer 31 in Figuur 20). De geringste hoeveelheden Eubacteriën (<100.000 genkopiën per bead) komen voor in een tweetal Bio-traps van locatie Bergen. In Figuur 20 is een differentiatie gemaakt naar ¹³C-gelabelde Bio-traps en standaard Bio-traps. Er is geen duidelijk verschil te zien in de hoeveelheid bacteriën tussen de twee typen Bio-traps.



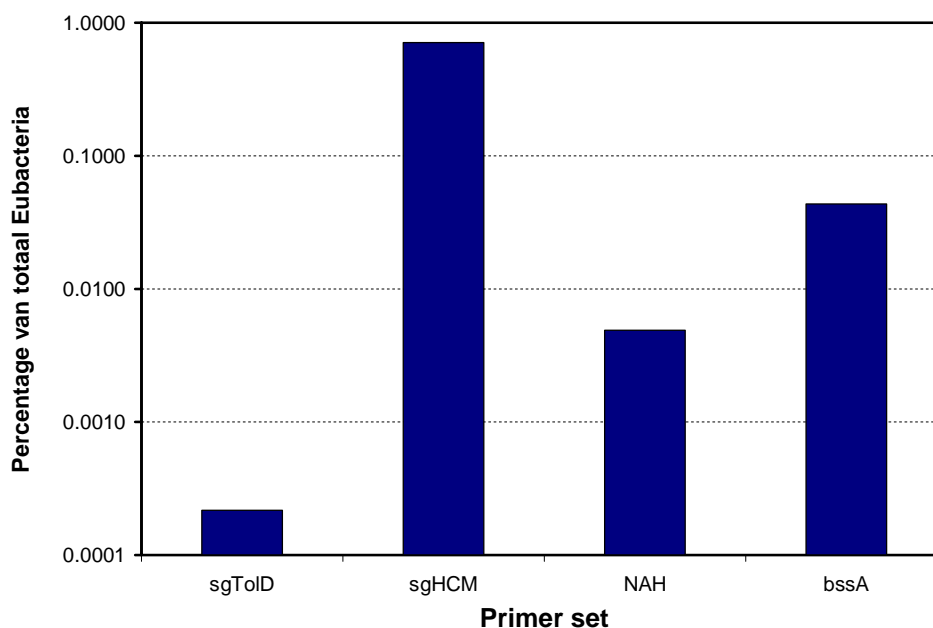
Figuur 20 Aantal genkopiën van Eubacteriën per Bio-sep bead voor alle onderzochte Bio-traps. De nummers op de X-as verwijzen naar Tabel 10.

Tabel 10 Overzicht van het aantal gencopiën per Bio-sep bead van de Eubacteriën.

No.	Locatie	Bio-Trap	qEuBac
1	Nijmegen	¹³ C MtBE	1.18E+07
2	Nijmegen	Standaard	1.08E+07
3	Nijmegen	¹³ C MtBE	3.68E+06
4	Nijmegen	¹³ C MtBE	5.07E+06
5	Nijmegen	Standaard	1.88E+07
6	Nijmegen	¹³ C MtBE	1.03E+07
7	Nijmegen	Standaard	1.95E+07
8	Nijmegen	Standaard	4.30E+07
9	Bergen	¹³ C Benzeen	4.72E+06
10	Bergen	Standaard	2.38E+05
11	Bergen	¹³ C Benzeen	1.25E+06
12	Bergen	¹³ C Benzeen	5.64E+04
13	Bergen	Standaard	5.49E+04
14	Bergen	¹³ C Benzeen	1.41E+07
15	Bergen	¹³ C Benzeen	7.60E+06
16	Bergen	Standaard	5.36E+06
17	Bergen	¹³ C Benzeen	2.57E+06
18	Bergen	Standaard	1.48E+05
19	Froombosch	¹³ C Benzeen	1.80E+06
20	Froombosch	¹³ C Benzeen	1.60E+06
21	Froombosch	Standaard	1.20E+06
22	Froombosch	¹³ C Benzeen	2.12E+06
23	Froombosch	¹³ C Benzeen	2.57E+06
24	Froombosch	Standard	1.27E+06
25	Froombosch	¹³ C Benzeen	2.56E+06
26	Froombosch	Standaard	4.14E+05
27	Aalten	¹³ C Toluëen	1.58E+06
28	Aalten	Standaard	3.07E+06
29	Aalten	¹³ C Toluëen	1.08E+07
30	Aalten	Standaard	5.12E+06
31	Benzeenreactor	¹³ C Benzeen	2.22E+07

5.2 Benzeenreactor

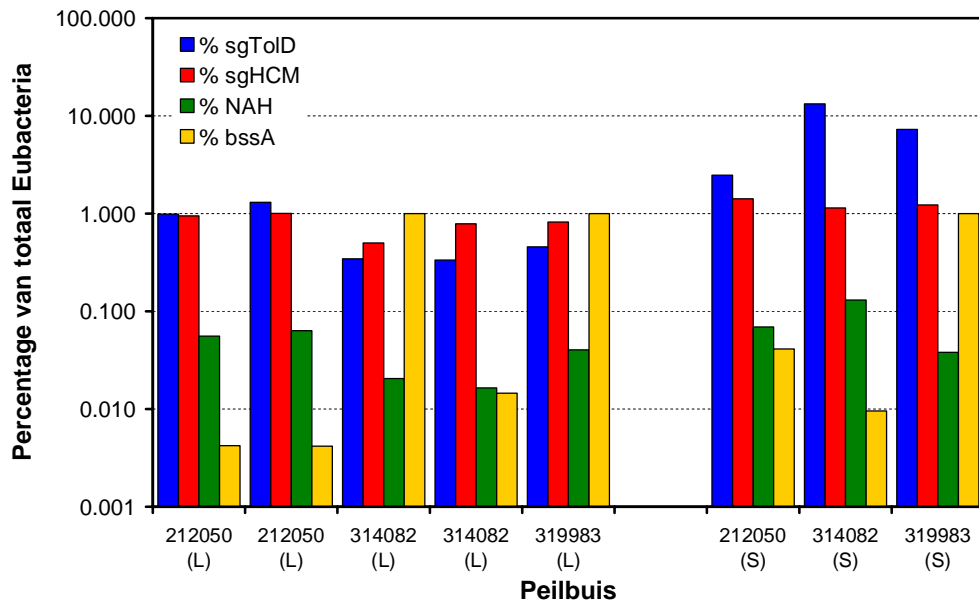
De DNA analyses van deze Bio-trap tonen aan dat hoogstwaarschijnlijk andere bacteriën of enzymen actief zijn in de benzeen reactor dan aangetoond via de hier gebruikte 4 primer sets. De hoeveelheid gencopiën vanuit deze sets bedragen slechts 0.76% van de totale populatie Eubacteriën (zie Figuur 21).



Figuur 21 Procentueel aandeel in de totale hoeveelheid 16SrRNA genen van Eubacteriën van de 4 catabolische genen in de benzeenreactor.

5.3 Froombosch

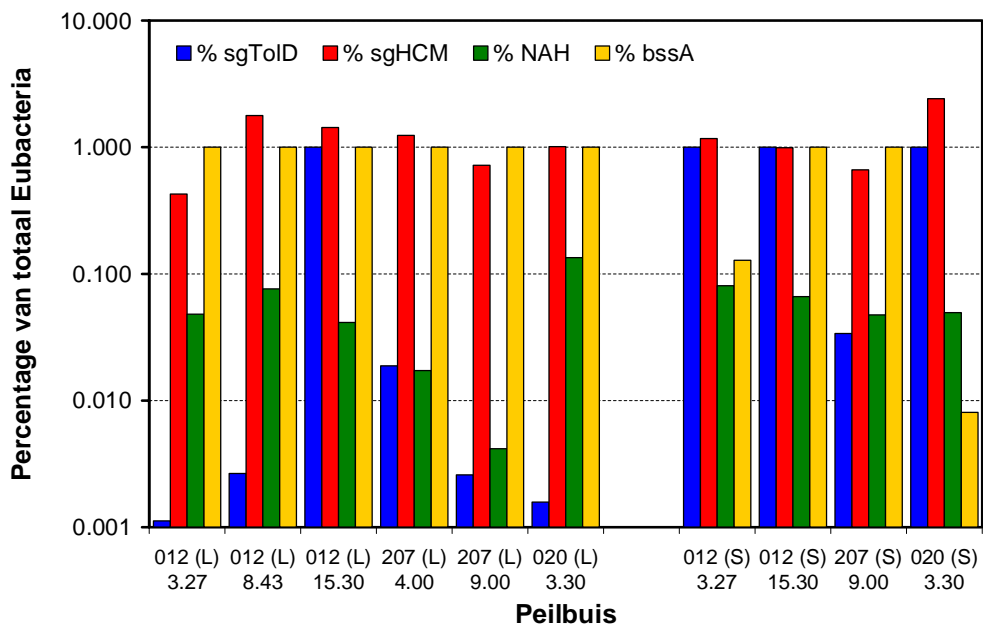
In deze locatie is vooral het procentuele aandeel van het gen dat codeert voor het enzym toluen-dioxygenase dat verantwoordelijk is voor de afbraak van BTEX relatief hoog in de peilbuizen 314082 en 319983. Vergelijking met de resultaten van de isotopenmetingen toont aan dat een verhoogd percentage van dit gen correleert met een aanrijking van ^{13}C in de fosfolipiden. De koolstofisotopenratio van de fosfolipiden in peilbuis 314083 (S) is ongeveer 450‰ en het gen dat betrokken is bij de aerobe afbraak van BTEX vertegenwoordigt hier ongeveer 14 procent van het totale aantal Eubacteriën. De sterkste aanrijking in ^{13}C treedt op in peilbuis 212050(S) met een isotopenratio van ongeveer 2450‰, het gen betrokken bij de BTEX afbraak vormt hier ongeveer drie procent van de totale populatie. In peilbuis 319983(S) treedt geen aanrijking op, toch is hier een hoog percentage van het gen dat codeert voor het enzym dat betrokken is bij de aerobe afbraak van BTEX. Kennelijk is de potentie voor aerobe afbraak aanwezig maar niet actief, waarschijnlijk omdat het grondwater hier anaeroob is.



Figuur 22 Procentueel aandeel van de 4 catabolische genen van locatie Froombosch in de totale hoeveelheid 16srRNA genkopiën van Eubacteriën.

5.4 Bergen

Voor locatie Bergen (^{13}C benzeen gelabelde Bio-trap) is het procentuele aandeel van gen dat codeert voor het enzym dat betrokken is in de afbraak van MtBE relatief hoog en varieert van ongeveer 0.5% tot ongeveer 2.5% van de totale genpopulatie (Figuur 23). Het gen dat betrokken is bij de aerobe afbraak van benzeen vertegenwoordigt maximaal 0.03% van de totale populatie. Voor deze locatie is geen duidelijke correlatie aanwezig tussen het aantal genkopiën en de ^{13}C aanrijking in de vetzuren.

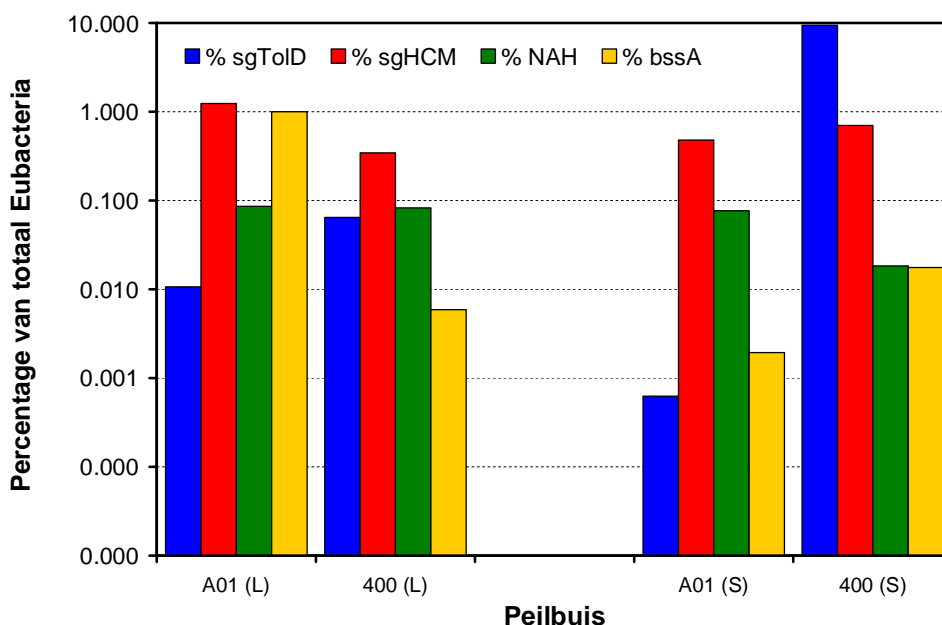


Figuur 23 Procentueel aandeel van de 4 catabolische genen van locatie Bergen in

de totale hoeveelheid 16srRNA genkopiën van Eubacteriën

5.5 Aalten

Voor deze locatie is met de PLFA analyse en de stable isotope probing (SIP) duidelijk aangetoond dat er natuurlijke afbraak van toluen plaatsvindt. De verwachting is dan ook dat het gen dat codeert voor het enzym dat betrokken is bij de anaerobe afbraak van toluen op deze locatie sterk verhoogd zou zijn (aangetoond met de primer set bssA). Dit is niet het geval. Wel is het gen dat betrokken is bij de aerobe afbraak van BTEX in peilbuis 400 met een hoog relatief percentage van bijna 10 procent aanwezig. Mogelijke oorzaak dat het gebruik van de bssA primer set geen resultaat oplevert is dat deze codeert voor het enzym betrokken bij de anaerobe afbraak van toluen en dat de huidige afbraak van toluen via een andere route plaatsvindt. Om bovenstaande redenering te onderbouwen moet eerst bepaald worden of het grondwater aerob of anaerob is.

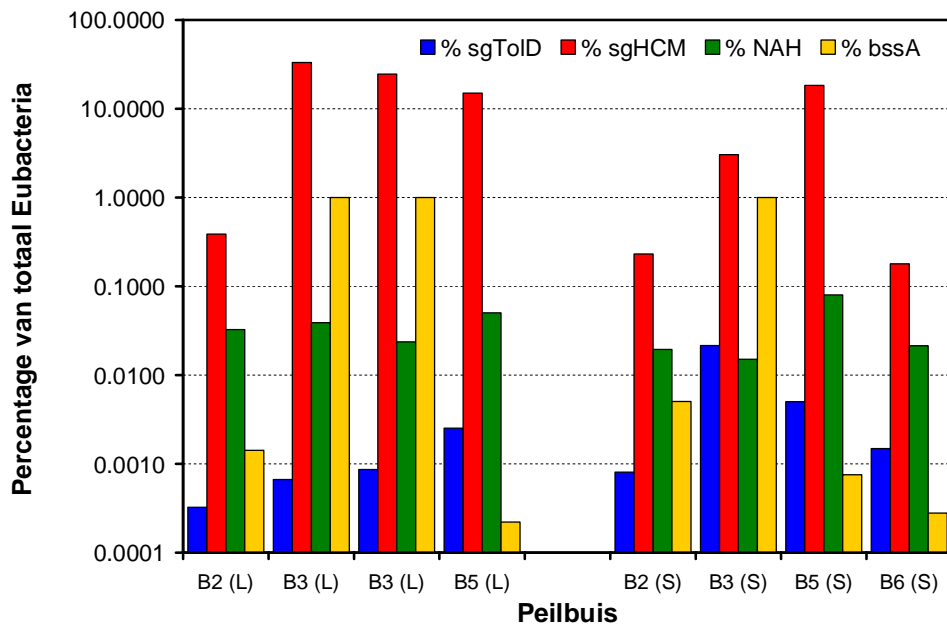


Figuur 24 Procentueel aandeel van de 4 catabolische genen van locatie Aalten in de totale hoeveelheid 16srRNA genkopiën van Eubacteriën.

5.6 Nijmegen

Het gen dat betrokken is bij de afbraak van MtBE is in zeer grote hoeveelheden aanwezig op de locatie Nijmegen. Het aantal sgHCM genen correspondeert hier tot maximaal ongeveer 35 procent van de Eubacteriële 16srRNA genen. Opvallend is dat de aanwezigheid van gelabeld substraat nauwelijks invloed heeft op de relatieve hoeveelheid genen. De ¹³C aanrijking in de fosfolipiden is voor deze locatie het minst sterk in vergelijking met de andere locaties. De sterkste aanrijking, gemeten als een isotopenwaarde van ongeveer 30‰, treedt op in de Bio-trap uit peilbuis B5(L). In deze peilbuis vinden we niet het hoogste percentage genkopiën.

Mogelijke verklaring voor de relatief geringe ^{13}C aanrijking is dat het MtBE bij de anaerobe afbraak niet de enige of belangrijkste koolstofbron is.



Figuur 25 Procentueel aandeel van de 4 catabolische genen van locatie Nijmegen in de totale hoeveelheid 16srRNA genkopiën van Eubacteriën.

6 Conclusies en aanbevelingen

1. Voor alle onderzochte locaties is met behulp van de Bio-trap techniek, in combinatie met stable isotope probing (SIP), het actuele optreden van Natuurlijke Afbraak aangetoond
2. Met de introductie van deze techniek in Nederland kan het optreden van natuurlijke afbraak mogelijk efficiënter in kaart worden gebracht. Relatief dure monitorings-programma's kunnen gereduceerd worden doordat deze *in situ* techniek een betrouwbaar beeld geeft van de actuele afbraak via slechts één enkele bemonstering.
3. Via de Bio-trap techniek kan worden vastgesteld dat afbraak van benzeen, toluen of MtBE plaatsvindt op een locatie. Op basis van de resultaten kan echter niet zondermeer een uitspraak worden gedaan over de afbraaksnelheden.
4. Op basis van de resultaten van een Bio-trap analyse uit één peilbuis kunnen geen eenduidige conclusies worden getrokken met het wel of niet optreden van natuurlijke afbraak op de locatie (zie resultaten van Nijmegen en Bergen).
5. Er zal meer aandacht moeten worden besteed aan de afgifte van componenten aan het grondwater wanneer gebruik wordt gemaakt van gelabelde Bio-traps. De concentratie van de opgebrachte componenten moet waarschijnlijk meer in overeenstemming worden gebracht met de concentratie van de daadwerkelijke verontreiniging. Ook geldt dat als je zeer hoge concentraties van contaminanten gebruikt in de Bio-traps je mogelijk wel goede inbouw krijgt van het label in de PLFAs, terwijl als je meer de in-situ concentraties gebruikt dit niet gebeurt.
6. Door de afgifte van ^{13}C gelabelde component aan het grondwater is het gedurende een bepaalde periode niet zinvol om isotopenmetingen op deze component in het grondwater uit te voeren. De lengte van deze periode is afhankelijk van de omzettingssnelheid en grondwaterstroming.
7. Indien meerdere Bio-traps in een peilbuis worden gehangen kan uitwisseling van de ^{13}C gelabelde component plaatsvinden.
8. Het feit dat de exacte samenstelling van de primer sets vertrouwelijk is belemmert een duidelijke interpretatie van de mogelijke afbraakroutes.
9. Voor een goede interpretatie van, vooral, de DNA data is het noodzakelijk om gegevens te hebben over de redox condities (aeroob vs. anaeroob)

-
10. Er zal nog nader onderzoek moeten worden verricht naar de incubatietijd van de Bio-traps. Mogelijk dat 6-8 weken niet voldoende is en dat de incubatietijd verlengd zal moeten worden naar bijvoorbeeld een halfjaar.
 11. De correlaties tussen genen en afbraak waren niet altijd even duidelijk in de studie. Het lijkt dan ook dat de DNA analyses niet echt essentieel zijn voor het monitoren of aantonen van afbraak. Een alternatief zou zijn om in plaats van DNA naar mRNA te gaan kijken. mRNA is indicatief voor activiteit, DNA voor potentieel.
 12. Het feit dat de Bio-trap techniek door een patent is gedekt kan een obstakel zijn voor een bredere en kostengunstige toepassing

7 Literatuur

- Bastiaens, L. & Gemoets, J. (2008) Reference report for performance verification of the Biotrap samplers (ENVIROGENE). ETV Promote report, contract no. 518074; 44 pp.
- Busch-Harris, J., Sublette, K., Roberts, K.P., Landrum, C., Peacock, A.D., Davis, G., Ogles, D., Holmes, W.E., Harris, D., Ota, C., Yang, X. & Kolhatkar, A. (2008) Bio-traps coupled with molecular biological methods and stable isotope probing demonstrate the In Situ biodegradation potential of MTBE and TBA in gasoline-contaminated aquifers. *Groundwater Monitoring and Remediation*, 28(4): 47-62.
- Busch-Harris, J., Jennings, E., Sublette, K.L., Roberts, K.P., White, D.C., Peacock, A., Davis, G., Ogles, D., Holmes, W.E., Yang, X., Kolhatkar, R., Kolhatkar, A. & Beckmann, D. (2006) Monitoring subsurface microbial ecology and demonstrating *in situ* biodegradation potential using Bio-sep[®] Bio-traps. *Ecological Chemistry and Engineering*, 13(5): 349-372.
- Chang, Y.-J., Long, P. E., Geyer, R., Peacock, A.D., Resch, C.T., Sublette, K., Pfiffner, S., Smithgall, A., Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Stephen, J.R., Dayvault, R., Ortiz-Bernad, I., Lovley, D.R. & White, D.C. (2005) Microbial incorporation of ¹³C-labelled acetate at the field scale: Detection of microbes responsible for reduction of U(VI). *Environ. Sci. Technol.*, 39: 9039-9048.
- Geyer, R., Peacock, A.D., Miltner, A., Richnow, H.H., White, D.C., Sublette, K.L. & Kästner, M. (2005) In Situ Assessment of Biodegradation Potential Using Biotraps amended with ¹³C-labeled benzene or toluene. *Environ. Sc. Technol.*, 39: 4983-4989.
- Langenhoff, A. A. M., Ballerstedt, H., Gerritse, J. (2004). Efficient benzene degradation in an anaerobic denitrifying chemostat culture. 10th International Symposium on Microbial Ecology, Cancun, ISME-10.
- Stelzer, N., Büning, C., Pfeifer, F., Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C., Nijenhuis, I., Kästner, M. & Richnow, H.H. (2006) In situ microcosms to evaluate natural attenuation potentials in contaminated aquifers. *Organic Geochemistry*, 37: 1394-1410.
- Sublette, K.L., Peacock, A., White, D., Davis, G., Ogles, D., Cook, D., Kolhatkar, R., Beckmann, D. & Yang, X. (2006) Monitoring Subsurface Microbial Ecology in a sulfate-amended, gasoline-contaminated aquifer. *Groundwater Monitoring and Remediation*, 26(2): 70-78.
- Zhang, T. & Fang, H. H. P. (2006) Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 70: 281–289