

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**96.608  
BIOLOGISCHE AFBRAAK VAN BTEX EN CKW BIJ  
IN SITU BIORESTAURATIE

Afbreekbaarheid, vooronderzoek, karakterisatie en  
monitoring

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**Nederlands  
Biotechnologische In-situ Sanering

Onderzoeksprogramma

Trefwoorden:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**Bioafbreekbaarheid

Biodegradatie

Aromatische koolwaterstoffen

Vluchtige chloorkoolwaterstoffen

Karakterisatie

Monitoring

Consortium:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**Bioclear Milieutechnologie B.V., Groningen - tel. 050-5718455

Opstellers:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**drs. S. Keuning

drs. J.J. van der Waarde

ir. H.H.M. Baten

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.****Auteursrechten**

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of op enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van CUR/NOBIS.

Het is toegestaan overeenkomstig artikel 15a Auteurswet 1912 gegevens uit deze uitgave te citeren in artikelen, scripties en boeken, mits de bron op duidelijke wijze wordt vermeld, alsmede de aanduiding van de maker, indien deze in de bron voorkomt, "©"Biologische afbraak van BTEX en CKW bij in situ biorestauratie - Afbreekbaarheid, vooronderzoek, karakterisatie en monitoring", oktober 1996, CUR/NOBIS, Gouda."

**Aansprakelijkheid**

CUR/NOBIS en degenen die aan deze publicatie hebben meegewerkt, hebben een zo groot mogelijke zorgvuldigheid betracht bij het samenstellen van deze uitgave. Nochtans moet de mogelijkheid niet worden uitgesloten dat er toch fouten en onvolledigheden in deze uitgave voorkomen. Ieder gebruik van deze uitgave en gegevens daaruit is geheel voor eigen risico van de gebruiker en CUR/NOBIS sluit, mede ten behoeve van al degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt, iedere aansprakelijkheid uit voor schade die mocht voortvloeien uit het gebruik van deze uitgave en de daarin opgenomen gegevens, tenzij de schade mocht voortvloeien uit opzet of grove schuld zijdens CUR/NOBIS en/of degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt.

## VOORWOORD

Het programmamanagement van NOBIS kan op specifieke onderdelen van het programma partijen verzoeken een project uit te voeren. Dit zijn zogenaamde NOBIS ondersteunde projecten (NOP's). Deze projecten kunnen tweeledig van aard zijn:

- onderdelen, noodzakelijk voor het programma, waar kennisleemten en onderzoeksvragen nog onvoldoende voor zijn geformuleerd om initiatieven vanuit de markt effectieve kansen te bieden;
- directe ondersteuning bij specifieke programmamanagement vraagstukken.

Ten aanzien van de afbreekbaarheid van vluchtige aromaten (BTEX) en vluchtige chloorkoolwaterstoffen (Per, Tri etc.) was behoefte aan een state of the art ten aanzien van (potentiële) afbraakprocessen, de wijze van vooronderzoek en welke parameters gekarakteriseerd en gemonitord zouden moeten worden in veld situaties. NOBIS heeft Bioclear b.v. verzocht deze studie uit te voeren. Deze studie is gebruikt als basis voor een workshop gehouden op 25 juni 1996. Op basis hiervan is door het NOBIS management nadere invulling gegeven aan het thema karakteriseren en monitoren.



## INHOUD

SUMMARY	6
Hoofdstuk1INLEIDING .....	8
1.1Achtergrond .....	8
1.2Werkzaamheden .....	8
Hoofdstuk2BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN BTEX EN CKW .....	10
2.1Inleiding .....	10
2.2Overzichtstabellen van de afbreekbaarheid van BTEX en CKW met verschillende elektronacceptoren .....	10
2.3Conclusies .....	21
2.4Literatuur.....	22
Hoofdstuk3VOORONDERZOEK.....	30
3.1Inleiding .....	30
3.2Doel van de tests .....	30
3.2.1Resultaten.....	30
3.2.2Discussie .....	30
3.3Status van de tests .....	32
3.3.1Resultaten.....	32
3.3.2Discussie .....	32
3.4Conclusies en aanbevelingen.....	33
3.5Literatuur.....	34
Hoofdstuk4KARAKTERISATIE EN MONITORING .....	38
4.1Inleiding .....	38
4.2Monitoringstechnieken: doel.....	38
4.3Monitoringstechnieken: status .....	38
4.3.1Resultaten.....	38
4.3.2Discussie .....	41
4.4Monitoringsstrategie .....	42
4.5Conclusies en aanbevelingen.....	43
4.6Literatuur.....	44
BijlageABEGRIPPENLIJST	
BijlageBKARAKTERISATIE- EN MONITORINGSPARAMETERS	

## SUMMARY

### **Biodegradation of volatile aromatics (BTEX) and chlorinated hydrocarbons (CKW) during in situ bioremediation**

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**Biodegradability, pre-investigation studies, characterization and monitoring

In the framework of the Dutch NOBIS research program for in situ bioremediation a study has been performed to evaluate the biodegradability of volatile aromatic hydrocarbons (BTEX) and chlorinated aliphatic hydrocarbons under different redox conditions and the status and objectives of pre-investigation studies and characterization and monitoring techniques in relation to in situ bioremediation, in order to guide further research in this field.

#### *Biodegradability*

Biodegradation of 18 components under different redox conditions (oxygen, nitrate, Fe(III), Mn(IV), sulphate or carbon dioxide as electron acceptor) has been summarized.

All components investigated in this study except perchloroethene, tetrachloromethane and 1,1,1-trichloroethane can be mineralized under aerobic conditions. All compounds except monochlorobenzene can be completely biodegraded under anaerobic conditions.

For engineered in situ bioremediation aerobic (oxygen as electron acceptor), nitrate reducing (nitrate as electron acceptor) and methanogenic conditions (CO<sub>2</sub> as electron acceptor) are relevant. For intrinsic bioremediation processes also iron, manganese and sulphate can be relevant electron acceptors.

#### *Pre-investigation studies*

The status and objectives of different pre-investigation studies ranging from batch studies, column studies and pilot experiments in the field are described. To improve the predictability of pre-investigation studies, feed-back from results of bioremediation in the field to site specific pre-investigation studies is required.

#### *Characterization and monitoring*

A set of characterization and monitoring parameters including objectives and status of the techniques is presented. This includes: contamination, electron acceptors (O<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Fe<sup>3+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), biodegradation products (CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O, S<sup>2-</sup>, CH<sub>4</sub>, Cl<sup>-</sup>), detection of intermediates (e.g. vinyl chloride, catechol), selective degradation (component ratio's), biomass measurements, activity measurements (enzyme activities), bioassays, temperature, redox potential, pH and nutrients (N, P). There is a need for the development of valid monitoring strategies for in situ bioremediation.



## HOOFDSTUK 1

### INLEIDING

#### 1.1 Achtergrond

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**In opdracht van CUR/NOBIS is in het kader van in situ biorestauratie van BTEX- en CKW-verontreinigingen een studie uitgevoerd naar de afbreekbaarheid van BTEX- en CKW-componenten. Het doel van deze studie is handzame overzichten te leveren in de vorm van matrices en tabellen die in het kader van het NOBIS-programma kunnen worden gebruikt om een gerichte kennisontwikkeling op het gebied van de biologische in situ sanering van BTEX en CKW's te kunnen sturen en te bewaken. De onderzochte onderwerpen hebben betrekking op enerzijds de biologische afbreekbaarheid van BTEX en CKW onder verschillende redoxcondities en anderzijds op het in kaart brengen van methoden, technieken en richtlijnen voor vooronderzoek, monitoring en karakterisatie.

#### 1.2 Werkzaamheden

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**De studie is onderverdeeld in drie onderdelen:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**-biologische afbreekbaarheid van BTEX en CKW;

-vooronderzoek;

-karakterisatie en monitoring.

##### *Biologische afbreekbaarheid van BTEX en CKW*

De biologische afbreekbaarheid van BTEX en CKW's onder de verschillende redoxomstandigheden is door middel van een literatuuronderzoek geïnventariseerd en gepresenteerd in de vorm van een uitgebreide matrix, waarin de afbreekbaarheid van de verschillende verbindingen in combinatie met de mogelijke elektronacceptoren wordt weergegeven. Per stof is aanvullende informatie (schaal, type materiaal, overig en referenties) weergegeven in een aparte matrix. Hierdoor ontstaat een gemakkelijk raadpleegbaar overzicht, dat tevens een ingang biedt naar gedetailleerde achtergrondinformatie.

Voor de literatuurstudie is gebruik gemaakt van de internationaal beschikbare en geregistreerde literatuur van wetenschappelijke kwaliteit. Voor de ontsluiting van de literatuur is gebruik gemaakt van de internationale bestanden van Chemical Abstracts. Resultaten van studies die niet zijn onderbouwd met duidelijke en deugdelijke onderzoeksmethoden zijn buiten beschouwing gelaten.

##### *Vooronderzoek*

De beschikbare en/of nog te ontwikkelen methoden en technieken voor vooronderzoek (haalbaarheidstests, proces optimalisatieproeven en pilotproeven) zijn geïnventariseerd en weergegeven in de vorm van matrices met typen vooronderzoek versus doel en status van de tests.

##### *Karakterisatie en monitoring (technieken en strategie)*

De beschikbare en/of nog te ontwikkelen methoden en technieken voor (biologische) monitoring en karakterisatie voor zover deze zijn gericht op het vastleggen en volgen van biologische processen zijn geïnventariseerd en weergegeven in de vorm van matrices van biologische, fysische en chemische parameters versus doel en ontwikkelingsstadium van de techniek. Voor de status van de monitoringstechnieken is alleen literatuur die betrekking heeft op veldwaarnemingen (pilot of full-scale) gebruikt. Op deze wijze wordt duidelijk in hoeverre de verschillende technieken daadwerkelijk worden toegepast in de praktijk.

Daarnaast is in een aparte kolom weergegeven of in de literatuur methoden beschreven staan voor het uitvoeren van de analyse. Deze methoden kunnen betrekking hebben op laboratoriumanalyses



of op veldanalyses met een andere verontreiniging dan BTEX of CKW's. Deze kolom geeft inzicht in de beschikbaarheid van een methode, maar geeft geen informatie over de toepasbaarheid van de methoden bij biorestauratie van BTEX of CKW's.

Voor zowel de inventarisatie van het vooronderzoek en de karakterisatie en monitoring is de internationale wetenschappelijke literatuur geraadpleegd. Met name de recente 11-delige proceedings van het symposium in situ and on site bioreclamation, dat in april 1995 is gehouden in San Diego, Californië, vormt een belangrijke bron van gegevens.

Tot slot wordt opgemerkt dat deze studie niet de pretentie heeft volledig te zijn. De inhoud van de studie wordt bepaald door de gescreende literatuur en additionele informatie kan aanwezig zijn in overige literatuur. Daarnaast kan er een hoeveelheid praktische informatie aanwezig zijn bij ingenieurs- en adviesbureaus, aannemers, leveranciers van apparatuur en kennisinstututen die niet in de openbare literatuur is verschenen.

## HOOFDSTUK 2

### BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN BTEX EN CKW

#### 2.1 Inleiding

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** In tabel 1 is de biologische afbreekbaarheid van 18 aromatische koolwaterstoffen en gechlorideerde koolwaterstoffen weergegeven, zoals die regelmatig worden aangetroffen bij bodemverontreinigingen. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen de verschillende elektronacceptoren die een rol kunnen spelen bij het afbraakproces.

Tabel 1. Redoxreacties.

elektron-acceptor	proces	halfreactie	redoxpotentiaal (E°h) in mV bij pH 7
O <sub>2</sub>	aëroob	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$	+ 830
Fe <sup>3+</sup>	ijzerreductie	$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	+ 770
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitraatreductie	$2NO_3^- + 12H^+ + 10e^- \rightarrow N_2(g) + 6H_2O$	+ 740
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitraatreductie	$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$	+ 420
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	sulfaatreductie	$SO_4^{2-} + 10H^+ + 8e^- \rightarrow H_2S + 4H_2O$	<b>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.- Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.220</b>
CO <sub>2</sub>	methanogenese	$CO_2(g) + 8H^+ + 8e^- \rightarrow CH_4(g) + 2H_2O$	<b>Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.- Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.240</b>

Bij de afbraak van organische stoffen komen elektronen vrij die uiteindelijk worden overgedragen op elektronacceptoren. Onder aërobe condities is zuurstof de elektronacceptor. Onder anaërobe omstandigheden kan in plaats van zuurstof onder andere nitraat, ijzer, mangaan, sulfaat of kooldioxide als elektronacceptor worden gebruikt. Soms kan ook een chloorkoolwaterstof, zoals PER, als elektronacceptor worden gebruikt. Bij deze redoxreacties, waarbij elektronen worden overgedragen van de ene component (elektron donor of reductor) naar de andere component (elektron acceptor of oxidator), komt energie vrij die de micro-organismen kunnen benutten voor hun groei. De hoeveelheid energie die vrijkomt is afhankelijk van het verschil in redoxpotentiaal tussen de verschillende redoxkoppels.

#### 2.2 Overzichtstabellen van de afbreekbaarheid van BTEX en CKW met verschillende elektronacceptoren

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** In tabel 2 is de microbiologische afbreekbaarheid van 18 verschillende componenten met verschillende elektronacceptoren samengevat. Wanneer volledige afbraak tot onschadelijke producten als water, kooldioxide, chloride enzovoorts mogelijk is (volledige mineralisatie), wordt dit aangegeven met een + of ++ afhankelijk van de snelheid waarmee het afbraakproces optreedt. Een + betekent dat het proces verloopt met een halfwaardetijd van weken of maanden. Een ++ betekent dat het proces verloopt met een halfwaardetijd van maximaal uren of dagen. Processen die in deze laatste categorie vallen zijn daarmee in principe ook interessant voor toepassing in bioreactoren, terwijl de categorie + praktisch

alleen voor langduriger processen, bijvoorbeeld in situ, in aanmerking komt. De aanduiding ± geeft aan dat de afbraak niet leidt tot volledige mineralisatie, maar dat er tussenproducten (metabolieten) worden gevormd die niet verder worden afgebroken. Een ? wil zeggen dat er geen informatie is omtrent de afbreekbaarheid van de verbinding omdat er geen onderzoek is gedaan, dan wel dat hierover niet is gerapporteerd in de literatuur. Bij de processen waar sprake is van cometabolisme, dus waarbij het organisme een andere koolstofbron nodig heeft voor groei (b.v. de aërobe afbraak van trichlooretheen, waarbij methaan of fenol nodig is als primaire koolstofbron), wordt dit aangegeven met (c).

Tabel 2. Afbreekbaarheid van BTEX en CKW met verschillende elektronacceptoren.

component	elektronacceptor					
	1 O <sub>2</sub>	2 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3 Fe <sup>3+</sup>	4 MN <sup>4+</sup>	5 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6 CO <sub>2</sub>
1. benzeen	++	-/±	+	?	++	+
2. toluen	++	++	+	+	++	+
3. ethylbenzeen	++	+	?	?	+	±
4. o-xyleen	++	+	+	?	+	+
5. m-xyleen	++	+	+	?	+	+
6. p-xyleen	++	+	?/+	?	+	+
7. fenol	++	++	+	?	+	+
8. perchlooretheen	-	-	?	?	±	++
9. trichlooretheen	++ c	-	?	?	±	++
10. cis-1,2-dichlooretheen	++ c	-	?	?	±	+;++
11. trans-1,2-dichlooretheen	++ c	?	?	?	±	+;++
12. vinylchloride	++	?	?	?	-/±	+;++
13. dichloormethaan (methyleenchloride)	++	+	?	?	?	+
14. trichloormethaan (chloroform)	+ c	-	?	?	±	+;++
15. tetrachloormethaan	-	+	±	?	±	+;++
16. 1,2-dichloorethaan	++	?	?	?	?	++
17. 1,1,1-trichloorethaan	± c	-	?	?	?	+;++
18. monochloorbenzeen	++	-	?	?	-	-

?onbekend doordat er geen onderzoek is gedaan of niets is gerapporteerd

-geen afbraak aangetoond

±gedeeltelijke afbraak

+volledige mineralisatie mogelijk:

++:t½ = uren/dagen

+:t½ = weken/maanden

ccometabolisme

In de tabellen 2.1 tot en met 2.18 wordt per component de mate van afbreekbaarheid uitgebreid met:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**-informatie betreffende de schaal waarop de afbreekbaarheid is aangetoond (lab of veld);

-of de afbreekbaarheid is aangetoond met geïsoleerde reïncultures of mengcultures, dan wel in grond, slib of grondwater;

- of er sprake is van gebruik van de verontreiniging als primair groeisubstraat (metabolisme) of dat een andere koolstofbron nodig is (cometabolisme) en eventueel andere bijzonderheden;
- één of twee representatieve referenties.

Tabel 2.1. Benzeen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	-/±	+	?	++	+
Schaal	lab veld	veld	lab veld		lab	lab
Materiaal	reincultures mengcultures grond(water)	grondwater	sediment grondwater		mengcultuur sediment	mengcultuur
Overig	veel beschreven als benzeen C-bron	lijkt moeilijk lab: geen afbraak veld: wel afname	adsorptie speelde ook een rol		benzeen als C-bron tot 1 g/l 260 mg/l.dag	benzeen als enige C-bron
Referenties	talrijk Gibson en Subramanian 1984	Major et al. 1988 Hutchins 1991 Jensen en Arvin 1994	Lovley et al. 1994		Chaudhuri en Wiesman 1995 Lovley et al. 1995	Vogel en Grbi_-Gali_ 1986 Grbi_-Gali_ en Vogel 1987

Tabel 2.2. Tolueen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	++	+	+	++	+
Schaal	lab veld	lab veld	lab veld	lab	lab	lab
Materiaal	reincultures mengcultures grond(water)	reincultures mengculture	reincultuur uit grond	mengcultuur uit grond en	reincultures mengcultures grond sediment	mengcultures uit slib en
Overig	veel beschreven tolueen als C-bron	tolueen als C-bron	tolueen als C-bron remming bij > 920 mg/l tolueen	er is een onbekende cofactor nodig	tolueen als C-bron	tot 166 mg/l tolueen als C-bron

Referenties	talrijk	Zeyer et al.	Lovley et al.	Langenhof	Rabus et al.	Vogel en
	Duetz et al.	1986	1990	1996	1993	Grbi_-Gali_
	1994	Evans et al.	Lovley et al.		Edwards et al.	1986 Edwards
		1991	1994		1992	en Grbi_-Gali_
						1994

Tabel 2.3. Ethylbenzeen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	+	?	?	+	±
Schaal	lab veld	lab	veld		veld	lab
Materiaal	reincultures grond(water)	mengcultuur	grond(water)		grondwater	grondwater
Overig					t½ = 230 dagen	> 40 week
Referenties	Eaton en Timmis 1986	Jensen en Arvin 1994 Hutchins et al. 1991	Hunt et al. 1995		Thierrin et al. 1993	Wilson et al. 1986 Bouwer 1995

Tabel 2.4. o-Xyleen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	+	+	?	+	+
Schaal	lab veld	lab	veld		lab veld	lab veld
Materiaal	reincultures grond(water) mengcultures	grondwater	grond(water)		mengcultuur	mengcultuur grondwater
Overig	1 g/l o-xyleen als C-bron	o-xyleen gaat moeilijker dan p/m-xyleen xyleen als C-bron			< 30 mg/l	50 mg/l
Referenties	Schraa et al. 1986 Barbierri et al.	Kuhn et al. 1985 Jensen en Arvin	Hunt et al. 1995		Edwards et al. 1992	Wilson et al. 1986 Edwards en

1993

1994

1994

Grbi\_-Gali\_



Tabel 2.5. m-Xyleen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	+	+	?	+	+
Schaal	lab veld	lab veld	veld		lab	veld
Materiaal	reincultures grond(water) mengcultures	mengcultures grond(water)	grond(water)		mengcultuur	grondwater
Overig	m-xyleen als C-bron	m-xyleen als C-bron				
Referenties	Gibson 1984	Kuhn et al. 1985 Jensen en Arvin 1994	Hunt et al. 1995		Edwards et al. 1992	Wilson et al. 1986

Tabel 2.6. p-Xyleen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	+	+/?	?	+	+
Schaal	lab veld	lab veld			lab	veld
Materiaal	reincultures mengcultures grond(water)	mengcultures grond(water)			mengcultuur	grondwater
Overig						
Referenties	Gibson 1984	Kuhn et al. 1985 Jensen en Arvin 1994 Häner et al. 1995	Hunt et al. 1995		Edwards et al. 1992	Wilson et al. 1986



Tabel 2.7. Fenol.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	++	+	?	+	+
Schaal	lab veld	lab	lab		lab	lab
Materiaal	reincultures grond(water)	reincultures mengcultures	reincultuur uit grond		mengcultuur	reincultuur mengcultuur
Overig	er zijn veel organismen beschreven					
Referenties	Menke en Rehm 1992 talrijk	Khoury et al. 1992	Lovley en Lonergan 1990		Gallert et al. 1993	Zhang en Wiegel 1994

Tabel 2.8. Perchlooretheen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	-	-	?	?	±	++
Schaal					lab	lab
Materiaal					mengcultuur grondwater	reincultuur mengcultuur grond(water)
Overig					er is een koolstofbron nodig; afbraak tot C-DCE	er is een koolstofbron nodig; eindproducten: etheen/ethaan
Referenties	Oldenhuis et al. 1991	Bouwer en Wright 1988			Bagley en Gosset 1990	de Bruin et al. 1992

Cole et al. 1995

Wild et al.  
1995

Opmerking: Onder anaërobe condities is aangetoond dat Per zelf ook als elektronacceptor kan optreden.

Tabel 2.9. Trichlooretheen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	-	?	?	±	++
Schaal	lab veld				lab	lab
Materiaal	reincultures grond(water)				reincultures mengcultures grond(water)	reincultures mengcultures grond(water)
Overig	het betreft cometabolisme; er is een cosubstraat nodig (methaan, tolueen, fenol)			C-bron nodig; er wordt DCE	er is een C-bron nodig (b.v. acetaat) gevormd	er is een
Referenties	Talrijk Oldenhuis et al. 1991 Hopkins et al. 1993 Hopkins et al. 1995	Bouwer en McCarty 1983		1990	Cole et al. 1995 Bagley en Gosset Wild et al. 1995	Talrijk de Bruin et al. 1992

Tabel 2.10. Cis-1,2-dichlooretheen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	-	?	?	±	+ / ++
Schaal	lab veld				lab	lab
Materiaal	reincultures mengcultures grond(water)				reincultures mengcultures grond(water)	reincultures mengcultures grond(water)
Overig	het betreft cometabolisme; cosubstraat is				er is een C-bron nodig; bij PCE- en TCE-afbraak	

	methaan		hoopt Cis-DCE op	
Referenties	Henson et al. 1988	Bouwer en McCarty 1983	Cole et al. 1995	de Bruin et al. 1992 Tandol et al. 1994

Tabel 2.11. Trans-1,2-dichlooretheen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	?	?	?	±	+ / ++
Schaal	lab veld				lab	lab
Materiaal	reincultures mengcultures grond(water)				reincultures mengcultures grond(water)	reincultuur mengcultuur grond(water)
Overig	het betreft cometabolisme met als cosubstraat methaan				er is een C-bron nodig; bij PCE- en TCE-afbraak hoopt C-DCE op	
Referenties	Henson et al. 1988 Hopkins et al. 1995				Cole et al. 1995	de Bruin et al. 1992 Tandol et al. 1994

Tabel 2.12. Vinylchloride.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	?	?	?	- / ±	+ / ++
Schaal	lab				lab	lab
Materiaal	reincultures grond(water)				mengcultures	reincultures mengcultures
Overig					onvolledige omzetting	soms treedt accumulatie van vinyl- chloride op bij afbraak choorethenen

Referenties	Hartmans et al. 1992	Cole et al. 1995	de Bruin et al. 1992
	Davis et al. 1990		Tandol et al. 1994



Tabel 2.13. Dichloormethaan.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	+	?	?	?	+
Schaal	lab veld	lab				lab
Materiaal	reincultures bioreactoren op praktijkschaal	reincultuur grondwater				reincultuur mengcultuur
Overig					afbraak;	acetogene DCM is C-bron
Referenties	Leisinger et al. 1993 Stucki 1990	Kohler Staub et al. 1995				Magli et al. 1995 Freedman et al. 1991

Tabel 2.14. Trichloormethaan.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	+	-	?	?	±	+ / ++
Schaal	lab				lab	lab
Materiaal	reincultuur				reincultuur	reincultuur mengcultuur
Overig	het betreft cometabolisme met methaan als C-bron					methanol als C-bron
Referenties	Oldenhuis et al. 1991	Bouwer en McCarty 1983			Egli et al. 1987	Bagley en Gosset 1995

Vanelli et al.  
1990

Tabel 2.15. Tetrachloormethaan.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	-	+	±	?	±	+ / ++
Schaal	lab	lab	lab		lab	lab
Materiaal		reincultuur mengcultuur	reincultuur		reincultuur	reincultuur
Overig						er is een C-bron nodig
Referenties	Oldenhuis et al. 1991 Vanelli et al. 1990	Bouwer en McCarty 1983 Dybas et al. 1995	Picardal et al. 1995		Egli et al. 1987	Mikesell en Boyd 1990

Tabel 2.16. 1,2-Dichloorethaan.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	?	?	?	?	++
Schaal	lab veld					lab
Materiaal	reincultuur bioreactoren voor grondwater op praktijkschaal					mengcultuur
Overig	5 - 20 m <sup>3</sup> /hr grondwater van 10 °C					acetogene cultuur; glucose als C-bron
Referenties	Janssen et al. 1985					Wild et al. 1995

Stucki et al.  
1992  
Stucki et al. 1995

Tandol et al.  
1994

Tabel 2.17. 1,1,1-Trichloorethaan.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	±	-	?	?	?	+ / ++
Schaal	lab					lab
Materiaal	reincultuur					mengcultuur
Overig	cometabolisme met methaan als C-bron					
Referenties	Oldenhuis et al. 1991 Vanelli et al. 1990	Bouwer en McCarty 1983 Bouwer en Wright 1988				Gälli et al. 1989

Tabel 2.18. Monochloorbenzeen.

	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>4+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>
Biodegradatie	++	-	?	?	-	-
Schaal	lab	lab			lab	lab
Materiaal	reincultures					
Overig						
Referenties	Schraa et al. 1986 Haigler et al. 1992	Bouwer en McCarty 1983			Beurskens 1995	Bosma et al. 1988

### 2.3 Conclusies

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**-Alle 18 in deze studie onderzochte componenten zijn, hetzij aëroob of hetzij anaëroob, in principe volledig microbiologisch afbreekbaar.

- Van de 18 onderzochte componenten zijn onder aërobe omstandigheden alle componenten volledig biologisch afbreekbaar, behalve (tot nu toe) perchlooretheen, tetrachloormethaan en 1,1,1-trichloorethaan.
- Onder anaërobe omstandigheden zijn alle componenten, behalve monochloorbenzeen, volledig afbreekbaar gebleken.
- Voor de BTEX-verbindingen geldt dat afbraak onder aërobe condities, dus met zuurstof als elektronacceptor, in de meeste gevallen het snelst verloopt. Voor alle BTEX-componenten is een snelle en volledige aërobe mineralisatie mogelijk.
- Bij afbraak van BTEX onder anaërobe condities kan onder andere nitraat als elektronacceptor dienst doen, met uitzondering van benzeen dat zich tot nu toe in de meeste onderzoeken slecht laat afbreken onder denitrificerende condities (zowel in mengsels van BTEX als in situaties met alleen benzeen). Sulfaatreducerende en methanogene condities (sulfaat respectievelijk  $\text{CO}_2$  als elektronacceptor) blijken voor de afbraak van benzeen betere resultaten op te leveren dan nitraat. Voor de overige BTEX-componenten geldt dat de resultaten voor nitraatreducerende en sulfaatreducerende condities (en deels methanogene condities) vergelijkbaar zijn.
- Voor de afbraak van gechlloreerde koolwaterstoffen onder aërobe omstandigheden geldt in het algemeen dat hoe meer chlooratomen de component bevat hoe moeilijker de afbraak verloopt of zelfs helemaal niet, zoals bij perchlooretheen en tetrachloormethaan.
- Voor de afbraak van gechlloreerde koolwaterstoffen onder anaërobe condities geldt in het algemeen juist het omgekeerde, namelijk dat de dechlorering sneller is naarmate de verbinding meer chlooratomen bevat.
- Er zijn verschillende micro-organismen bekend die perchlooretheen als elektronacceptor gebruiken in plaats van zuurstof, nitraat, ijzer, mangaan of kooldioxide.
- Anaërobe afbraak van BTEX en CKW's, zoals die in de literatuur wordt beschreven, heeft vaak betrekking op respectievelijk denitrificerende en methanogene condities. In een aantal gevallen is aangetoond dat ijzer (III), mangaan (IV) of sulfaat als elektronacceptor kan fungeren bij de afbraak van BTEX en CKW's. Op dit gebied is de kennis echter fragmentarisch en nog in ontwikkeling.
- Voor in situ biorestatietechnieken, waarbij de biodegradatieprocessen actief worden gestimuleerd, zijn de aërobe ( $\text{O}_2$  als elektronacceptor), de denitrificerende ( $\text{NO}_3^-$  als elektronacceptor) en de methanogene condities ( $\text{CO}_2$  als elektronacceptor) van belang.
- De overige elektronacceptoren (ijzer, mangaan en sulfaat) zijn voornamelijk interessant voor intrinsieke biodegradatieprocessen die verlopen met de van nature in de bodem aanwezige voorraden van deze elektronacceptoren. Het toevoegen van deze elektronacceptoren aan het bodempakket kan praktische bezwaren met zich meebrengen, zoals de vorming van ongewenste precipitatie of de vorming van waterstofsulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) in het geval van sulfaat.
- Voor alle onderzochte componenten, behalve perchlooretheen, tetrachloormethaan en 1,1,1-trichloorethaan (alleen anaëroob) en monochloorbenzeen (alleen aëroob), kan in principe zowel een aërobe als een anaërobe saneringsvariant worden gekozen. Welke aanpak wordt gekozen kan per situatie verschillen en is afhankelijk van bijvoorbeeld:
  - .de beschikbare tijd voor het saneringsproces en dus de gewenste afbraaksnelheid;
  - .de praktische uitvoerbaarheid op de locatie;
  - .de haalbaarheid (technisch, kosten vergunningen) van het toevoegen van een cosubstraat (b.v. methaan of fenol) in het geval van een afbraakmechanisme op basis van cometabolisme;
  - .mengsels van verontreinigingen en de samenstelling hiervan (toxische effecten, preferente afbraak, componenten die elk een andere elektronacceptor vereisen);
  - .het ter plaatse aanwezige microbiële biodegradatiepotentieel en de mate waarin de gewenste microbiële activiteit eventueel kan worden gestimuleerd.

## 2.4 Literatuur

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

**Bagley, D.M. en J.M. Gosset (1990)** Tetrachloroethene transformation to trichloroethene and Cis-1,2-dichloroethene by sulfate reducing enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(8): 2511-2516.

**Bagley, D.M., en J.M. Gosset (1995)**

Chloroform degradation in methanogenic methanol enrichment cultures and by *Methanosarcina barkeri* 227.

*Appl. Environ. Microbiol.* 61(91): 3195-3201.

**Barbierri, P., L. Palladino, P. Di Gennaro en E. Galli (1993)**

Alternative pathways for o-xylene or m-xylene and p-xylene degradation in a *Pseudomonas stutzeri* strain.

*Biodegradation* 4: 71-80.

**Beurskens, J.E.M. (1995)**

Microbial transformation of chlorinated aromatics in sediments.

Thesis Landbouwniversiteit Wageningen, ISBN 90-5485-395-6.

**Bosma, T.N.P., J.R. van der Meer, G. Schraa, M.E. Tros en A.J.B. Zehnder (1988)**

Reductive dechlorination of all trichloro- and dichlorobenzene isomers.

*FEMS Microbiol Ecol.* 53: 223-229.

**Bouwer, E.J (1985)**

Secondary utilization of trace halogenated organic compounds in biofilms.

*Environ. Progr.* 4: 43-46.

**Bouwer, E.J. en P.L. McCarty (1983)**

Transformation of 1- and 2- carbon halogenated aliphatic organic compounds under denitrification conditions.

*Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1295-1299.

**Bouwer, E.J. en J.P. Wright (1988)**

Transformation of trace halogenated aliphatics in anoxic biofilm columns.

*J. Contaminant Hydrology* 2: 155-169.

**Chaudhuri, B.K. en U. Wiesmann (1995)**

Enhanced anaerobic degradation of benzene by enrichment of mixed microbial culture and optimization of the culture medium.

*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 178-187.

**Cole, J.R., B. Fathepure en J. Tiedje (1995)**

Tetrachloroethane and 3-chlorobenzoate dechlorination activities are co-induced in *Desulfomonite tiedjei* DCB-1.

*Biodegradation* 6: 167-172.

**Davis, J.W. en C.Z. Carpenter (1990)**

Aerobic biodegradation of vinylchloride in groundwater samples.  
Appl. Environ. Microbiol. 56(12): 3878-3880.

**De Bruin, W.P., M.J. Kotterman, M.A. Postumus, G. Schraa en A. Zehnder (1992)**

Complete biological reductive transformation of tetrachloroethane to ethane.  
Appl. Environ. Microbiol. 58(6): 1996-2000.

**Duetz, W.A., C. de Jong, P.A. Williams en J.G. van Andel (1994)**

Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene.  
Appl. Environ. Microbiol. 60: 2858-2863.

**Dybas, M.J., G.M. Tatara en C.S. Criddle (1995)**

Localization and characterization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain K.C.  
Appl. Environ. Microbiol. 61(20): 758-762.

**Eaton, R.W. en K.N. Timmis (1986)**

Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204.  
J. Bacteriol. 168: 123-131.

**Edwards, E.A. en D. Grbi\_-Gali\_ (1992)**

Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions.  
Appl. Environ. Microb. 58: 2663-2666.

**Edwards, E.A. en D. Grbi\_-Gali\_ (1994)**

Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium.  
Appl. Environ. Microbiol. 60: 313-322.

**Egli, C., R. Scholtz, A.M. Cook en T. Leisinger (1987)**

Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp. and *Methanobacterium* sp.  
FEMS Microbiol. Lett. 43: 257-261.

**Evans, P.J., D.T. Mang en L.Y. Young (1991)**

Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures.  
Appl. Microbiol. Environ. 57: 450-454.

**Freedman, D.L. en J.M. Gossett (1991)**

Biodegradation of dichloromethane and its utilization as a growth substrate under methanogenic conditions.  
Appl. Environ. Microbiol. 57(10): 2847-2857.

**Gallert, C. en J. Winter (1993)**

Uptake of phenol by the phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 627-631.



**Gälli, R. en P.L. McCarty (1989)**

Kinetics of biotransformation of 1,1,1-trichloroethane by *Clostridium* sp strain TCAIIB.  
Appl. Environ. Microbiol. 55(4): 845-851.

**Gibson, D.T. en V. Subramanian (1984)**

Microbial degradation of aromatic hydrocarbons.  
In: Microbial degradation of organic compounds (edited by D.T. Gibson). Dekker inc., New York.

**Grbi\_-Gali\_, D. en T.M. Vogel (1987)**

Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures.  
Appl. Environ. Microbiol. 53: 254-260.

**Haigler, B.E., C.A. Pettigrew en J. Spain (1992)**

Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150.  
Appl. Environ. Microbiol. 58(7): 2237-2244.

**Häner, A., P. Hohener en J. Zeyer (1995)**

Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture.  
Appl. Environ. Microbiol. 61: 3185-3188.

**Hartmans, S. en J.A.M. de Bont (1992)**

Aerobic vinylchloride metabolism in *Mycobacterium aureum* L1.  
Appl. Environ. Microbiol. 56(12): 3878-3880.

**Henson, J.M., M.V. Yates, J.W. Cochran en D.L. Shackelford (1988)**

Microbial removal of halogenated methanes, ethanes and ethylenes in an aerobic soil exposed to methane.  
FEMS Microbiol. Ecol. 53: 193-201.

**Hopkins, S.D., L. Semprini en P.L. McCarty (1993)**

Microcosm and in situ field studies of enhanced biotransformation of trichloroethylene by phenol-utilizing microorganisms.  
Appl. Environ. Microbiol. 59(7): 2277-2285.

**Hopkins, G.D. en P.L. McCarty (1995)**

Field evaluation of in situ aerobic cometabolism of trichloroethylene and three dichloroethylene isomers using phenol and toluene as the primary substrates.  
Environ. Sci. Technol. 29: 1628-1637.

**Hunt, M.J., M. Beckmann, M.A. Barlaz en R.C. Borden (1995)**

Anaerobic BTEX biodegradation in laboratory microcosms and *in-situ* columns. In: Intrinsic bioremediation (edited by R.E. Hinchee, J.T. Wilson and D.C. Downey).  
Battelle Press, Columbus, USA.

**Hutchins, S.R., et al. (1991)**

Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions.

Environ. Sci. Technol. 25: 68-74.

**Hutchins, S.R, (1991a)**

Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as terminal electron acceptor.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 2403-2407.

**Hutchins, S.R, (1991b)**

Optimizing BTEX biodegradation under denitrifying conditions.  
Environ. Toxicol. Chem. 10: 1437-1448.

**Janssen, D.B., A. Scheper en B. Witholt, (1985)**

Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10.  
Appl. Environ. Microbiol. 49: 673-677.

**Jensen, B.K. en E. Arvin, (1994)**

Aromatic hydrocarbon degradation specificity of an enriched denitrifying mixed culture.  
In: Hydrocarbon bioremediation (edited by R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoepfel and R.N. Miller). CRC Press, USA.

**Khoury, N., W. Dott en P. Kämpfer (1992)**

Anaerobic degradation of phenol in batch and continuous cultures by a denitrifying bacterial consortium.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 524-528.

**Kohler-Staub, D.S. Frank en T. Leisinger (1995)**

Dichloromethane as the sole carbon sources for *Hyphomicrobium* sp. strain DM2 under denitrification conditions.  
Biodegradation 6: 229-235.

**Kuhn, E.P., P.J. Colberg, J.L. Schnoor, O. Wanner, A.J.B. Zehnder en R.P. Schwarzenbach, (1985)**

Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: Laboratory column studies.  
Environ. Sci. Technol. 19: 961-968.

**Langenhof, A.A.M (1996)**

Anaerobic transformation of toluene under manganese-reducing conditions.  
Agricultural University Wageningen, The Netherlands (in press).

**Leisinger, T. en R. Bader (1993)**

Microbial dehalogenation of synthetic organohalogen compounds: Hydrolytic dehalogenases.  
Chimia 47: 116-121.

**Lovley, D.R. en D.J. Lonergan (1990)**

Anaerobic oxidation of toluene, phenol and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15.  
Appl. Environ. Microbiol. 56: 1858-1864.

**Lovley, D.R., J.C. Woodward en F.H. Chapelle (1994)**

Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands.  
Nature (London) 370: 128-131.

**Lovley, D.R., J.D. Coates, J.C. Woodward en E.J.P. Phillips (1995)**

Benzene oxidation coupled to sulfate reduction.  
Appl. Environ. Microbiol. 61: 953-958.

**Magli, A., F.A. Rainey en T. Leisinger (1995)**

Acetogenesis from dichloromethane by a two component mixed culture comprising a novel bacterium.  
Appl. Environ. Microbiol. 61(8): 2943-2949.

**Major et al. (1988)**

Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand.  
Ground Water 26: 8-14.

**Menke, B. en H.-J. Rehm (1992)**

Degradation of mixtures of monochlorophenols and phenol as substrates for free and immobilized cells.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 655-661.

**Mikesell, M.D. en S.A. Boyd (1990)**

Dechlorination of chloroform by Methanosarcina strains.  
Appl. Environ. Microbiol. 56(4): 1198-1201.

**Oldenhuis, R., I.Y. Oedzes, J.J. van der Waarde en D.B. Janssen (1991)**

Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by Methylosimes trichosporium OB36 and Toxicity of trichloroethylene.  
Appl. Environ. Microbiol. 57(1): 7-14.

**Picardal, F., R.G. Arnold en B.B. Huey (1995)**

Effects of electron donor and acceptor conditions on reductive dehalogenation of tetrachloromethane by Shewanella putrefaciens 200.  
Appl. Environ. Microbiol. 61(1): 8-12.

**Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig en F. Widdel (1993)**

Complete oxidation of toluene under strict anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium.  
Appl. Environ. Microbiol. 59: 1444-1451.

**Schraa, G., M.L. Boone, M.S.M. Jetten, A.R.W. van Neerven, P.J. Colberg en A.J.B. Zehnder, (1986)**

Degradation of 1,4-dichlorobenzene by Alcaligenes sp strain A175.  
Appl. Environ. Microbiol. 52: 1347-1381.

**Stucki, G. (1990)**

Biological decomposition of dichloromethane from a chemical process effluent.  
Biodegradation 1: 221-228.

**Stucki, G., M. Thüer en R. Bentz (1992)**

Biological degradation of 1,2-dichloroethane under groundwater conditions.  
Wat. Res. 26(3): 273-278.

**Stucki, G. en M. Thüer (1995)**

Experiences of a large scale application of 1,2-dichloroethane degrading microorganisms for groundwater treatment.  
Environ. Sci. Technol. 29(9): 2339-2345.

**Tandol, V., T.D. Distefano, P.A. Bowser, J.M. Gossett en S.H. Zinder (1994)**

Reductive dehalogenation of chlorinated ethenes and halogenated ethanes by a high rate anaerobic enrichment culture.  
Environ. Sci. Technol. 28: 973-979.

**Thierrin, J., G.B. Davis, C. Barber, B.M. Patterson, F. Pribac, T.R. Power en M. Lambert (1993)**

Natural degradation rates of BTEX compounds and naphthalene in a sulfate-reducing groundwater environment.  
J. Hydro. Sci. 38: 309-322.

**Vanelli, T., M. Logan, D.M. Arciero en A.B. Hooper (1990)**

Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*.  
Appl. Environ. Microbiol. 56(4): 1169-1171.

**Vogel, T.M. en D. Grbi\_Gali\_ (1986)**

Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentive transformation.  
Appl. Environ. Microbiol. 52: 200-202.

**Wild, A.P., W. Winkelbauer en T. Leisinger (1995)**

Anaerobic biodegradation of trichloroethene, tetrachloroethene and 1,2-dichloroethane by an acetogenic mixed culture in a fixed bed reactor.  
Biodegradation 6: 309-318.

**Wilson, B.H., G.B. Smith en J.F. Rees (1986)**

Biotransformation of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer material: a microcosm study.  
Environ. Sci. Technol. 20: 997-1002.

**Zeyer, J., E.P. Kuhn en R.P. Schwarzenbach (1986)**

Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen.  
Appl. Environ. Microbiol. 52: 944-947.

**Zhang, X. en J. Wiegel (1994)**

Reversible conversion of 4-hydroxybenzoate and phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4182-4185.



## HOOFDSTUK 3

### VOORONDERZOEK

#### 3.1 Inleiding

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** Voorafgaand aan een biologische in situ sanering wordt vooronderzoek uitgevoerd. Dit vooronderzoek kan worden ingedeeld in vijf categorieën:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** -literatuurstudie;

-biodegradatietoetsen (bacterietests);

-batchtests;

-kolomtests;

-pilottests.

Per categorie bestaan uiteraard vele variaties in de precieze vorm van de uitvoering (testomvang, opzet, testduur, enz.). Vooronderzoek wordt gebruikt om de toepasbaarheid van een potentieel geschikte techniek vast te stellen.

#### 3.2 Doel van de tests

##### 3.2.1 Resultaten

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** In tabel 3 is aangegeven welke informatie met de verschillende vormen van vooronderzoek wordt verkregen.

Tabel 3. Vooronderzoek : Doel van de tests.

testdoel	soort test				
	literatuur- studie	biodegrada- tietoets	batch- test	kolom- test	pilot- test
aantonen biologische afbreekbaarheid	+	+	+-	-	-
maximale verwijderingssnelheid in grond	-	-	+	-	-
gesimuleerde veld verwijderingssnelheid	-	-	-	+	-
reële veld verwijderingssnelheid	-	-	-	-	+
biologische versus niet-biologische processen	-	+	+-	+	-
nutriënten consumptie	-	-	+	+	-
restconcentratie	-	-	+	+-	-
biologische beschikbaarheid	-	-	+	+-	-
doorlatendheid grond	-	-	-	+-	+
selectie monitoringstechnieken	+-	-	+-	+	+-

+hoofddoel

+/-nevendoel

-niet mogelijk, niet nodig

##### 3.2.2 Discussie

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** Het type test dat zal worden toegepast, wordt bepaald door de vraagstelling en het testdoel (119). In het algemeen zal bij toenemende beschikbaarheid van informatie het soort test in tabel 3 verschuiven van links naar rechts.

Bij een zeer lage beschikbaarheid van kennis zal vaak eerst een literatuuronderzoek worden uitgevoerd, om bijvoorbeeld een indicatie te krijgen over de biologische afbreekbaarheid van een verbinding. Ook kan op deze manier informatie beschikbaar worden gemaakt over het effect van locatiespecifieke condities op de biodegradatie.

Is uit de literatuur bekend dat een stof biologisch afbreekbaar is, dan kan een biodegradatietoets worden uitgevoerd. Vaak gebeurt dit als er nog weinig tot geen ervaring is met biodegradatie van de verbinding en informatie nodig is over analysemethoden, wijze van uitvoering van tests en indicatieve biodegradatiesnelheden. In de biodegradatietoets wordt de (pure) verbinding in een kweekmedium gebracht met een bacteriële (rein)culture en wordt onder goed omschreven laboratoriumcondities afbraak van de component gevolgd.

Voor specifieke CKW's zal soms nog een biodegradatietoets worden uitgevoerd, maar voor de meeste CKW's en voor BTEX is het eerste testniveau meestal een batchtest.

In een batchtest wordt een bepaalde hoeveelheid grond van een locatie onder goed omschreven laboratoriumcondities geïncubeerd. Biodegradatie wordt doorgaans bepaald aan de hand van verdwijnen van de verontreiniging, O<sub>2</sub>-consumptie (of een andere elektronacceptor) en/of CO<sub>2</sub>-productie. Vaak zal getracht worden een massabalans op te stellen over de incubatie. Op deze wijze wordt inzicht verkregen in het aandeel biologische versus niet-biologische processen in de verwijdering van de verontreiniging. Het hoofddoel van de batchtest is om aan te geven of de verontreiniging in de bodem in potentie voldoende biologisch afbreekbaar is om een biorestauratie aantrekkelijk te maken.

Bij een succesvolle afsluiting van een batchproef kan een kolomproef worden uitgevoerd. Deze kolom wordt veelal uitgevoerd met gepakte grond van de locatie, dat wil zeggen het grondmonster is verstoord en in het laboratorium in een kolom gebracht. Een tweede, meer praktijkgerichte, uitvoering is de gestoken kolom waarbij, eventueel met behulp van boorapparatuur, een kolom in een holle buis wordt gestoken op locatie. Deze kolom wordt vervoerd naar het laboratorium en daar in een meetopstelling gebracht. Deze uitvoering is technisch complexer en duurder. In het laboratorium wordt de sanering, zoals die in het veld kan gaan worden uitgevoerd, nagebootst. Biodegradatie wordt bepaald aan de hand van parameters, zoals die ook in het veld zullen worden toegepast. Vaak is het niet goed mogelijk een massabalans op te stellen over de grondkolom.

Hoofddoelstelling van de kolomtest is kwantificeerbare informatie te verkrijgen over het verloop van de sanering, zoals biodegradatiesnelheid en duur van de sanering. De resultaten van de kolomtest worden gebruikt bij de definiëring en inrichting van de sanering. Hoewel kolomtests dichter bij de praktijk staan dan batchtests, blijft het grootste probleem bij kolomtests de vertaalslag van de resultaten uit de kolomtest naar een veldsituatie.

Als de onzekerheid over de wijze van uitvoering of het haalbare eindresultaat te groot wordt geacht, wordt een pilottest uitgevoerd. In de pilot wordt op de locatie een deelsanering uitgevoerd om het vooronderzoek en het saneringsconcept te verifiëren.

De kosten van de literatuurstudie, de biodegradatietoets en de batchtest liggen in dezelfde ordergrootte (f 1.000 - f 5.000). De kosten van kolomonderzoek vallen hoger uit en zijn sterk afhankelijk van de uitvoeringswijze van de test. Ditzelfde geldt voor pilotproeven.

Overgangsvormen tussen deze testmethoden zijn mogelijk, zoals bijvoorbeeld het inbrengen van een buis in het veld die vervolgens als in situ kolom wordt behandeld. Ook kan tijdens het vooronderzoek of de sanering worden teruggegrepen op een lager testniveau om specifieke deelvragen op te lossen, zoals het uitvoeren van literatuuronderzoek om benodigde informatie te verkrijgen of het uitvoeren van een batchtest om de biologische beschikbaarheid van een restfractie te bepalen.



Per locatie en situatie zal een afweging worden gemaakt over de wenselijkheid van de afzonderlijk tests.

### 3.3 Status van de tests

#### 3.3.1 Resultaten

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**In tabel 4 is het ontwikkelingsstadium van de verschillende batch-, kolom- en pilottests weergegeven.

Tabel 4. Vooronderzoek: Status van de tests.

condities	toepassing	
	BTEX	CKW
<i>batch</i>		
aërobe condities	+[1, 2, 3, 4, 26, 28, 30, 34]	+[1, 10, 20, 21, 53]
cometabolische condities	-	+[7, 8, 9, 19, 22]
denitrificerende condities	+-[27, 31, 33, 34, 36]	+-[21]
Fe/Mn reducerende condities	+-[24, 38]	?
SO <sub>4</sub> reducerende condities	+-[23, 35, 40]	+-[21]
methanogene condities	+-[12, 41]	+[12, 14, 15, 21, 48]
<i>kolom</i>		
aërobe condities	+[26, 29, 42]	+[1, 11, 13]
cometabolische condities	-	+-[16, 18, 54, 55]
denitrificerende condities	+-[29, 31, 39, 42]	+-[13]
Fe/Mn reducerende condities	?	?
SO <sub>4</sub> reducerende condities	+-[32]	+-[11]
methanogene condities	?	+[11, 13, 14, 15, 51]
<i>pilot</i>		
aërobe condities	+[25, 26, 47]	+-[1, 53]
cometabolische condities	-	+-[5, 6, 22, 43, 49]
denitrificerende condities	+-[25, 31, 44, 45, 46]	+-[17, 50]
Fe/Mn reducerende condities	+-[25]	?
SO <sub>4</sub> reductie condities	+-[25, 31, 32, 37, 46]	+-[56]
methanogene condities	+-[25]	+-[48, 52, 57]

+volledig ontwikkeld

+/-in ontwikkeling

-niet van toepassing

?onbekend

#### 3.3.2 Discussie

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**Vooronderzoek is met name beschreven voor actieve saneringen. Dit zijn saneringen waar de milieucondities in de bodem worden gemanipuleerd ten einde de biologische afbraak van de verontreiniging te stimuleren. Actieve saneringen die zijn beschreven, maken gebruik van de inbreng van zuurstof (aëroob), nitraat (anoxisch) en organisch koolstof (anaërobe dechlorering of cometabole afbraak).

Een aantal organisaties heeft omschrijvingen van diverse typen vooronderzoek gepubliceerd ten einde een vorm van standaardisatie in het uitvoeren van deze onderzoeken en de interpretatie van de resultaten te realiseren. De verschillende typen gestandaardiseerd vooronderzoek berusten wel op dezelfde principes, maar kennen grote verschillen in wijze van uitvoering. De meeste literatuur ten aanzien van vooronderzoek heeft betrekking op toegepast onderzoek, waarbij per situatie of onderzoeksgroep vaak een andere uitvoering is gebruikt. Dit betekent dat de gebruiker, die een vooronderzoek wil uitvoeren via de literatuur, de beschikking heeft over een groot aantal verschillende voorbeelden van (batch en kolom) vooronderzoek voor actieve sanering van BTEX en CKW's, maar dat er geen sprake is van een standaard uitvoeringsvorm.

Pilottests zijn veelvuldig beschreven voor actieve saneringen van BTEX en CKW's, maar deze tests zijn dermate locatiespecifiek dat per locatie een nieuw onderzoek moet worden opgesteld.

Bij passieve saneringen (intrinsieke biorestauratie) worden geen stimulerende maatregelen genomen en worden geen toevoegingen gedaan aan de grond. Intrinsieke biorestauratie wordt doorgaans door middel van veldmonitoring in kaart gebracht en vooronderzoek op laboratoriumschaal is nauwelijks beschreven.

De omvang van de intrinsieke biorestauratie-activiteit wordt in principe bepaald door de potentie in de bodem (aanwezigheid van biodegradatiepotentieel) door grondwaterstroming en door concentraties aan verontreiniging en elektronacceptoren.

Batchtests voor intrinsieke biorestauratie zijn niet beschreven in de literatuur. Batchtests zouden in principe ook bij intrinsieke biorestauratie kunnen worden toegepast om het biodegradatiepotentieel in de grond aan te tonen. Hierbij wordt echter wel een (onnatuurlijke) hoeveelheid substraat en/of elektrondonor toegevoegd aan de grond, waardoor verstoring van het natuurlijk evenwicht optreedt. De batchtest geeft hierdoor wel informatie over de aanwezigheid van specifieke biodegradatie-activiteit en over maximaal haalbare biodegradatiesnelheden onder de verschillende redoxcondities, maar niet over de actuele dominante processen in de bodem. Deze informatie kan alleen door middel van veldmonitoring worden verkregen.

Kolomtests voor intrinsieke biorestauratie zijn niet beschreven en waarschijnlijk lastig uit te voeren. Het is technisch lastig de specifieke, natuurlijke omstandigheden in de bodem na te bootsen op laboratoriumschaal. Dit in tegenstelling tot een kolomtest voor een actieve sanering, waar de procescondities zowel in het laboratorium als in het veld worden gemanipuleerd. Een mogelijke invulling van kolomtests of pilottests is het inbrengen en volgen van in situ kolommen.

### **3.4 Conclusies en aanbevelingen**

#### ***Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.* Conclusies**

- De meeste literatuur aangaande het vooronderzoek komt uit het buitenland, er is zeer weinig informatie over de Nederlandse situatie.
- Vooronderzoek is bijna altijd beschreven in combinatie met (toegepast) onderzoek en relatief weinig in combinatie met een actuele sanering.
- Protocollen voor aërobe batchtests zijn beschikbaar van DECHEMA (Duitsland), NETAC (VS) en CNRC-NRC (Canada).
- Er bestaan verschillende, soms gestandaardiseerde, uitvoeringen van batchtests. Hiernaar is geen vergelijkend onderzoek gedaan.
- Van kolomtests bestaan verschillende, zij het niet gestandaardiseerde, uitvoeringen. Hiernaar is geen vergelijkend onderzoek gedaan.
- Er is tot op heden geen laboratoriumvooronderzoek beschreven voor passieve saneringen (intrinsieke biorestauratie).
- Pilotervaring met betrekking tot anoxische en anaërobe (dechlorering) biorestauratie is in het buitenland redelijk beschreven. In Nederland is deze ervaring nog zeer beperkt.

### Aanbevelingen

- Het uitvoeren van vergelijkend onderzoek naar beschikbare batchtests in Nederland.
- Het ontwerpen van een vooronderzoek voor passieve saneringen (intrinsieke biorestauratie), op basis van batchtests (bepalingen van het biodegradatiepotentieel).
- Het verder ontwikkelen en standaardiseren van vooronderzoek onder anoxische en anaërobe condities voor actieve saneringen.
- Het uitvoeren van pilotexperimenten onder anoxische en anaërobe condities met gebruikmaking van ervaringen uit de Verenigde Staten.

### 3.5 Literatuur

- Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
1. Laboratory methods for the evaluation of biological cleanup processes, 1992. DECHEMA, Frankfurt am Main, Germany.
  2. Samson et al., 1992, Demonstration of a new biotreatability protocol to monitor a bioprocess for the treatment of contaminated soils. NRC-CNRC.
  3. NETAC, 1993, Evaluation methods manual "Oil spill response bioremediation agents".
  4. Guide for conducting treatability studies under CERCLA: "Aerobic biodegradation laboratory screening", 1990. US EPA.
  5. Hopkins et al., 1993, Microcosm and in situ field studies of enhanced biotransformation of trichloroethylenen by phenol utilizing microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2277-2285.
  6. Hopkins en McCarthy, 1995, Field evaluation of *in situ* aerobic cometabolism of trichloroethylene and three dichloroethylene isomers using phenol and toluene as the primary substrates. Environ. Sci. Technol. 29: 1628-1637.
  7. Mu en Scow, 1994, Effect of trichloroethylene (TCE) and toluene concentrations on TCE and toluene biodegradation and the population density of TCE and toluene degraders in soil. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2661-2665.
  8. Yagi et al., 1994, Bioremediation of trichloroethylene contaminated soils by a methane utilizing bacterium *Methylocystis* sp.M. Bioremediation of chlorinated and PAH compounds. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 28-36, CRC Press Inc.
  9. Walton en Anderson, 1990, Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1012-1016.
  10. Davis en Carpenter, 1990, Aerobic biodegradation of vinyl chloride in groundwater samples. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3878-3880.
  11. Van der Meer et al., 1993, Versatility of soil column experiments to study biodegradation of halogenated compounds under environmental conditions. Biodegradation 3: 265-284.
  12. Wilson et al., 1986, Biotransformations of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer material: a microcosm study. Environ. Sci. Technol. 20: 997-1002.
  13. Bosma et al., 1995, Comparison of reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in rhine sediment and model systems with hydroxocobalamin. Environ. Sci. Technol. 28: 1124-1128.
  14. De Bruin et al., 1992, Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1996-2000.
  15. Vira et al., 1992, Technological requirements for the maintenance of specialized cultures in the subsurface environment: complete biodegradation of PCE. Preprint.
  16. Enzien et al., 1994, Reductive dechlorination of trichloroethylene and tetrachloroethylene under aerobic conditions in a sediment column. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2200-2204.
  17. Semprini et al., 1992, In situ transormation of carbon tetrachloride and other halogenated compounds resulting from biostimulation under anoxic conditions. Environ. Sci. Technol. 26: 2454-2461.
  18. Moore et al., 1989, Biodegradation of trans-1,2-dichloroethylene by methane utilizing bacteria in an aquifer simulator. Environ. Sci. Technol. 23: 403-407.

19. Fan and Scow, 1993, Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1911-1918.
20. Bachmann et al., 1988, Aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 548-554.
21. Bachmann et al., 1988, Biodegradation of alpha- and beta hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 143-149.
22. Oremland et al., 1994, Degradation of methyl bromide by methanotrophic bacteria in cell suspensions and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3640-3646.
23. Lovley et al., 1995, Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 953-958.
24. Lovley et al., 1994, Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature* 370: 128-131.
25. Wilson et al., Natural bioreclamation of alkylbenzenes (BTEX) from a gasoline spill in methanogenic groundwater. *Hydrocarbon Bioremediation*, p. 202-218, CRC Press Inc.
26. Allen-King et al., 1994, Limitations on the biodegradation rate of dissolved BTEX in a natural unsaturated, sandy soil: evidence from field and laboratory experiments. *Hydrocarbon Bioremediation*, p. 175-191, CRC Press Inc.
27. Major et al., 1988, Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand. *Ground Water* 26: 8-14.
28. Thomas et al., 1990, Biodegradation of BTEX in subsurface materials contaminated with gasoline: granger, Indiana. *Wat. Sci. Tech.* 22: 53-62.
29. Anid et al., 1993, Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate. *Wat. Res.* 27: 685-691.
30. Nielsen and Christensen, Spatial variability of aerobic degradation potential for organic pollutants. *Hydrocarbon Bioremediation*, p. 409-415, CRC Press Inc.
31. Acton and Barker, 1992, In situ biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *J. Cont. Hydrol.* 9: 325-352.
32. Thierrin et al., 1993, Natural degradation rates of BTEX compounds and naphthalene in a sulphate reducing groundwater environment. *Hydrol. Sciences J.* 38: 309-322.
33. Hutchins, 1991, Optimizing BTEX biodegradation under denitrifying conditions. *Environ. Toxic. Chem.* 10: 1437-1448.
34. Hutchins, 1991, Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2403-2407.
35. Edwards and Grbi-Gali, 1992, Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microb.* 58: 2663-2666.
36. Hutchins et al., 1991, Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environ. Sci. Technol.* 25: 68-74.
37. Beller et al., 1995, Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of in situ bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2864-2870.
38. Langenhof et al., Anaerobic transformation of toluene under manganese reducing conditions. Submitted to *Appl. Environ. Microbiol.*
39. Kuhn et al., 1988, Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 490-496.
40. Beller et al., 1992, Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 786-793.
41. Edwards and Grbi-Gali, 1994, Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 313-322.
42. Kuhn et al., 1985, Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: laboratory column studies. *Environ. Sci. Technol.* 19: 961-968.

43. Semprini et al., 1990, A field evaluation of in-situ biodegradation of chlorinated ethenes: part 2, results of biostimulation and biotransformation experiments. *Ground Water* 28: 715-727.
44. Hutchins et al., 1995, In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 123-131, Batelle press Columbus USA.
45. Thomas et al., 1995. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 133-141, Batelle press Columbus USA.
46. Reinhard et al., 1995, In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 263-270, Batelle press Columbus USA.
47. Weymann et al., 1995, In: *In situ Aeration: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 167-175, Batelle press Columbus USA.
48. Odom et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 17-24, Batelle press Columbus USA.
49. Brockman et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 99-109, Batelle press Columbus USA.
50. Peyton et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 111-116, Batelle press Columbus USA.
51. Fogel et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 153-160, Batelle press Columbus USA.
52. Fathepure et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 169-186, Batelle press Columbus USA.
53. Peck et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 221-227, Batelle press Columbus USA.
54. LaPat-Polasko et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 255-261, Batelle press Columbus USA.
55. Chu et al, 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 281-288, Batelle press Columbus USA.
56. Lee et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 147-151, Batelle press Columbus USA.
57. Nielsen en Christensen, 1994, In: *Bioremediation of Chlorinated and PAH Compounds*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 416-421, CRC press Inc.



### KARAKTERISATIE EN MONITORING

#### 4.1 Inleiding

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** Om het biologische saneringsproces te kunnen volgen en zo nodig bij te sturen, is een actieve monitoring van het saneringsproces nodig. Hierbij kunnen chemische, fysische en biologische monitoringsparameters worden onderscheiden. Er is een selectie gemaakt van biologische, chemische en fysische parameters die bij in situ biorestauratie kunnen worden gebruikt om het biologische saneringsproces te volgen (zie 4.2).

Voorafgaand aan een sanering kan een uitgebreide karakterisatie van de locatie worden gemaakt om de situatie in de bodem vast te leggen (nulsituatie). Met betrekking tot de biologische processen, die zich in de bodem (kunnen) afspelen, kunnen dezelfde parameters worden gebruikt als voor de monitoring.

Daarnaast zijn voor een volledige veldkarakterisatie diverse, met name fysische, parameters van belang, waarop in het kader van deze studie niet verder wordt ingegaan, zoals:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**-bodemprofiel;

-korrelgrootteverdeling;

-specifiek oppervlak;

-porositeit;

-permeabiliteit;

-dispersie- en adsorptiecoëfficiënt;

-waterniveaumeting;

-region of influence (ROI);

-elektrische geleidbaarheid.

#### 4.2 Monitoringstechnieken: doel

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** Monitoring wordt uitgevoerd om inzicht te verkrijgen in actuele processen tijdens een sanering. Op basis van deze monitoring kan de voortgang van de sanering worden gevolgd en kunnen eventuele limitaties in het biodegradatieproces worden opgespoord. Monitoringsparameters leveren derhalve de informatie die nodig is bij het beïnvloeden van een sanering en kunnen daardoor bijdragen aan een efficiëntere uitvoering van de sanering en een kortere saneringsduur.

Van de geselecteerde monitoringsinstrumenten, die kunnen worden gebruikt bij in situ biorestauratie, zijn per monitoringstechniek de doelen van de techniek weergegeven in tabel 5.

#### 4.3 Monitoringstechnieken: status

##### 4.3.1 Resultaten

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** Van de geselecteerde monitoringsinstrumenten, die kunnen worden gebruikt bij in situ biorestauratie, is per monitoringstechniek het ontwikkelingsstadium van de toepassing weergegeven op pilot- of full-scale saneringen bij BTEX- en CKW-saneringen (zie tabel 6).

Tevens is de beschikbaarheid beschreven van methoden en technieken voor overige toepassingen.

Tabel 5. Monitoringstechnieken bij in situ biorestauratie: Doel van de techniek.

parameter	testdoel				
	aantonen verwijdering verontreiniging	aantonen biodegradatie verontreiniging	bepalen sanerings-snelheid	limiterende milieufactoren	relevantie milieurendement
verwijdering verontreiniging	+	-	+	-	+
verlies aan terminale elektronacceptoren: -O <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> -Fe <sup>2+</sup> -Mn <sup>4+</sup> -SO <sub>4</sub>	-	+	+	+-	-
detectie unieke producten biodegradatie: -CO <sub>2</sub> -NO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O tijdens denitrificatie -sulfide tijdens zwavelreductie -CH <sub>4</sub> tijdens methanogenese -chloride tijdens dechlorering	-	+	+-	+-	-
detectie intermediaire vorming: -epoxide DCE (cometabole oxidatie TCE) -anaërobe dechlorering producten -overig	+	+	-	-	+-
selectieve afbraak componenten: -verzadigd/aromatisch/polair ratio -laag- versus hooggechloreerd (aëroob) -C12/C13-ratio	+	+	+-	-	+-
biomassa bepalingen: -bacterietellingen -detectie specifieke bacteriën -secundaire populaties <sup>1)</sup>	-	+	-	-	+-
activiteitsmetingen: -enzymactiviteitsmetingen	-	+	-	+-	+-
toxiciteitstests: -bio-assays	-	-	-	+-	+
in situ respiratietest	-	+	+	-	-
toename in temperatuur	-	+	+	+-	-
redoxpotentiaal	-	-	-	+	-
pH	-	-	-	+	+-



nutriënten: -nitraat -N <sub>g</sub> ehidahl -orthofosfaat	-	-	-	+	-
---	---	---	---	---	---

<sup>1)</sup>bacterie-etende organismen

+hoofddoel

+/- nevendoeel

-niet mogelijk

Tabel 6. Monitoringstechnieken bij in situ biorestauratie: Status van de techniek op pilot of full-scale.

parameter	methode bekend		toepassing			
			BTEX		CKW	
	in situ	on/off site	in situ	on/off site	in situ	on/off site
verwijdering verontreiniging	+-	+	+[32]	+	?	+
verlies aan terminale elektronacceptoren:						
-O <sub>2</sub>	+	+	+[33, 35]	+[2, 7, 22, 23, 37]	+[25]	+[5]
-NO <sub>3</sub>	?	+	?	+[2, 3, 6, 16, 43, 44, 45]	?	+[43]
-Fe <sup>2+</sup>	-	+	-	+[2, 4, 16, 42, 43, 44, 45, 46]	-	+[43]
-Mn <sup>4+</sup>	-	+	-	+[42]	-	+[43]
-SO <sub>4</sub>	?	+	?	+[16, 37, 43, 44, 45, 46]	?	+[43, 48, 49]
detectie unieke producten biodegradatie:						
-CO <sub>2</sub>	?	+	+-	+[20, 21, 22, 23]	?	?
-NO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O tijdens denitrificatie	?	+	?	+[3, 17, 38, 42]	?	+[47]
-sulfide tijdens zwavelreductie	?	+	?	+[2, 46, 47]	?	?
-CH <sub>4</sub> tijdens methanogenese	?	+	?	+[3, 16, 43, 44]	?	+[43, 47, 49]
-chloride tijdens dechlorering	?	+	-	-	?	+[47]
detectie intermediaire vorming:						
-epoxide DCE (cometabole oxidatie TCE)	-	+	-	-	?	+[5]
-anaërobe dechlorering producten	-	+	-	-	?	+[8, 27, 47, 48, 49]
-overig	?	+-	-	+[14]		+[9]
selectieve afbraak componenten:						
-verzadigd/aromatisch/polair ratio	-	+	-	+[15, 17]	-	?
-laag- versus hooggechloreerd (aëroob)	-	+	-	-	-	?
-C12/C13-ratio	-	+	-	+[36]	-	?
biomassa bepalingen:						
-bacterietellingen	-	+	-	+[45]	-	?
-detectie specifieke bacteriën:						
. aërobe condities	-	+	-	+[23, 24, 30, 45]	-	+[28]
. cometabolische condities	-	+	-	-	-	+[1, 26, 29, 30, 51]
. denitrificerende condities	-	+	-	+[12]	-	?
. Fe/Mn reducerende condities	-	+	-	?	-	?
. SO <sub>4</sub> reducerende condities	-	+	-	?	-	+[27, 47]
. methanogene condities	-	+	-	?	-	+[10]
-enzymactiviteitsmetingen:						
. aërobe condities	-	+	-	+[39, 40, 50]	-	+[51]
. overige condities	-	?	-	?	-	?
-biomarkers	-	+	-	+[23, 30, 31, 34, 47]	-	+[26, 29, 30]
-secundaire populaties <sup>1)</sup>	-	+	-	+[41]	-	?
toxiciteitstests:						
-bio-assays	-	+	-	+[9, 11, 13, 18, 52]	-	?

in situ respiratietest	+	+	+	+ [16, 19, 22, 35]	?	?
toename in temperatuur	+	+	+/-	+ [45]	?	?
redoxpotentiaal	+/-	+	?	+ [45, 46]	?	+ [25, 47]
pH	+	+	?	+	?	+ [25, 47]
nutriënten:	-	+	-	+	-	+ [47]
-nitraat	?	+	-	+	-	+ [47]
-N <sub>g</sub> gehalte	-	+	-	+	-	?
-orthofosfaat	?	+	-	+	-	+ [47]

<sup>1)</sup>bacterie-etende organismen

+volledig ontwikkeld

+/-in ontwikkeling

-niet mogelijk

?onbekend

#### 4.3.2 Discussie

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** Het belang van de individuele monitoringsinstrumenten wordt bepaald door de kennisbehoefte tijdens de sanering. Verwijdering van de verontreiniging is vaak de belangrijkste parameter, aangezien de saneringsdoelstelling gebaseerd is op deze parameter. Deze parameter kan worden toegepast om de voortgang van de sanering te volgen en om het eindrendement te bepalen.

Biologische parameters zijn van belang om het biologische proces in kaart te brengen. Deze parameters geven, in tegenstelling tot analyses van de verontreiniging, inzicht in de actuele snelheid van het biodegradatieproces. Derhalve zou een set aan biologische parameters bepaald moeten worden tijdens de sanering. De meeste ervaring is opgebouwd in het uitvoeren van chemische analyses van de verontreiniging. In situ metingen van de verontreinigingsgraad, zoals bijvoorbeeld met radar, zouden een geschikte aanvulling kunnen vormen op de conventionele ex-situ analyses, maar er is op dit moment nog zeer weinig ervaring met deze methoden.

Metingen van redox-actieve verbindingen (elektronacceptoren en elektrondonoren) zijn van belang bij het monitoren van biodegradatie. Het betreft hier chemische analyses aan water en lucht die direct informatie opleveren over biologische processen in de bodem. De grootste problemen bij het toepassen van deze analyses is op dit moment het gebrek aan ervaring bij de (anaërobe) monsternamen en het ontbreken van een uitgebreid referentiekader. De analyses zelf zijn vaak gebonden aan het laboratorium waar de analysemethoden voldoende zijn uitgewerkt voor een standaard toepassing. De kennis ten aanzien van monsternamen en data-interpretatie is wel aanwezig bij diverse in situ projecten in het buitenland (VS). Een effectieve toepassing van deze methodieken kan worden versneld door gebruik te maken van deze kennis.

Biologische analyses worden in toenemende mate toegepast bij het monitoren van in situ biorestauratie. De toegepaste methoden zijn vaak niet goed gestandaardiseerd en er bestaat geen uitgebreid referentiekader voor de interpretatie van de meetdata. Op dit moment worden de data van de biologische monitoring voornamelijk gebruikt voor een indicatieve bepaling van biodegradatie. Als de methoden bruikbaar blijken voor een meer kwantitatieve bepaling van de biodegradatie zou dat een stimulans betekenen voor de toepassing van deze methoden, die daarmee een aanvulling zouden vormen op de chemische analyses. De in situ respiratietest is een geslaagd voorbeeld van een biologisch monitoringsinstrument waarmee kwantitatieve informatie wordt verkregen over de actuele biodegradatie en die in toenemende mate wordt toegepast.

Voor het bepalen van actuele milieurisico's bij in situ biorestauratie zijn chemische analyses alleen niet afdoende, omdat vaak slechts een beperkt aantal stoffen wordt gemeten. Tussenproducten of coverontreinigingen worden vaak niet bepaald. Parameters als biologische beschikbaarheid en cumulatieve toxische effecten van restfracties kunnen bepalend zijn voor het milieurisico van een verontreiniging en als zodanig worden gebruikt in de bepaling van de saneringsvoortgang en de saneringsurgentie van restfracties na afloop van een biorestauratieproject. Deze tekortkomingen kunnen deels worden ondervangen door de chemische beoordeling aan te vullen met bio-assays. Bio-assays zijn gestandaardiseerde laboratoriumexperimenten waarin meestal lagere diersoorten worden blootgesteld aan een milieumonster (oppervlakte grond- of afvalwater, waterbodembodem, grond enz.).

Het doel van bio-assays is het beoordelen of de aanwezige verontreinigingen in het monster in die mate beschikbaar zijn dat ze negatieve effecten (b.v. sterfte) veroorzaken bij deze dieren. Hiermee kunnen actuele milieurisico's worden gemeten. In Nederland is de ervaring met de toepassing van bio-assays voor de ecotoxicologische beoordeling van vervuilde bodems met name opgedaan bij de beoordeling van waterbodems. Voor terrestrische bodems is de praktische ervaring met het

toepassen van deze assays bij het monitoren en beoordelen van in situ biorestauratie nog zeer beperkt.

#### 4.4 Monitoringsstrategie

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** Belangrijke aspecten bij het opzetten van een monitoringsprogramma, vanuit het gezichtspunt van het volgen van de biologische processen, zijn:

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.** -welke parameters moeten worden gemonitord;

-wordt in situ of on/off site gemeten;

-hoe vindt de monstername plaats;

-wat is de frequentie van de metingen.

Het aantal monster/meetpunten per locatie en de ruimtelijke verdeling worden vooral bepaald door de heterogeniteit van de verontreiniging en de bodemopbouw, de omvang van de locatie en de saneringsopzet. Dit onderdeel van de monitoringsstrategie wordt hier verder buiten beschouwing gelaten.

##### *Monitoringsparameters*

Tot nu toe is bij in situ biorestauratie in Nederland nog relatief weinig monitoring verricht. De monitoring die is gedaan, richt zich grotendeels op de verwijdering van de verontreiniging en wordt in enkele gevallen aangevuld met monitoring op O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en bacterie-aantallen. Met de overige parameters, zoals genoemd in de tabellen 5 en 6, is derhalve nog (zeer) weinig ervaring.

##### *In situ of on/off site*

Het meten van de biologische processen bij een in situ sanering moet bij voorkeur in situ plaatshebben, aangezien het gaat om de actuele situatie in het bodempakket, zonder dat deze wordt verstoord door monstername, conservering en transport. Op dit moment is in situ meting nog maar voor een beperkt aantal parameters mogelijk. Parameters die op dit moment relatief eenvoudig in situ kunnen worden gemeten zijn pH, redox, temperatuur en O<sub>2</sub>, hoewel de toepassing hiervan in Nederland nog beperkt is. Voor de overige parameters moet een monster worden genomen dat on/off site wordt geanalyseerd.

##### *Monstername*

De monstername (indien nodig) bepaalt voor een groot deel de kwaliteit van de monitoring. Monstername en conservering zijn vastgelegd in een aantal NEN-voorschriften. Deze voorschriften zijn gericht op het bepalen van chemische en fysische parameters, en niet op het behoud en bepalen van de aanwezige biologische activiteit. Aangezien bij in situ biorestauratie niet alleen aërobe, maar soms ook anaërobe biologische processen worden gestimuleerd, zijn ook protocollen voor anaërobe monstername nodig. Deze protocollen zijn in Nederland in beperkte mate voorhanden, maar zijn in het buitenland op diverse locaties toegepast.

##### *Monitoringsfrequentie*

Hoe frequent monitoringsparameters moeten worden gemeten, hangt af van het verwachte verloop van de parameter tijdens de sanering. Hierbij kan onderscheid worden gemaakt in de beginperiode van de sanering, waarin stimulatie van het biologische proces plaatsheeft en de vervolperiode waarbij de biologische processen op een bepaald niveau worden gehandhaafd tot de sanering is voltooid. Dit betekent over het algemeen dat tijdens het begin van een actieve sanering intensiever/frequenter zal worden gemonitord dan tijdens de vervolperiode.

De ervaring met monitoringsprogramma's is echter dermate beperkt dat over minimaal vereiste monitoringsfrequenties nog weinig kan worden gezegd. Deze moet door praktijkonderzoek met

intensieve monitoringsprogramma's worden bepaald. Op grond hiervan zouden monitoringsparameters kunnen worden gecategoriseerd, bijvoorbeeld categorie 1 on line monitoring; categorie 2 monitoring iedere 0 - 2 maanden; categorie 3 monitoring iedere 6 - 12 maanden, enzovoorts.

#### 4.5 Conclusies en aanbevelingen

##### ***Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.***Conclusies

- Het volgen van de verontreiniging in gestoken monsters is de meest toegepaste monitoringsmethode voor het volgen van biologische afbraak bij in situ biorestauraties. Bij heterogene verontreinigingen wordt de interpretatie van de analyses doorgaans sterk bemoeilijkt. Bij BTEX en CKW's spelen deze problemen een minder grote rol.
- In situ detectie en kwantificering van verontreiniging is in een onderzoeksstadium. Onduidelijk is nog of kwantificering nauwkeurig genoeg is en of de methode economisch aantrekkelijk is.
- De in situ respiratietest bij bioventing ( $O_2/CO_2$ -meting) is een in het buitenland veelgebruikte en goed gedocumenteerde en bruikbare techniek. Het is niet duidelijk in hoeverre deze techniek in Nederland wordt toegepast en of toepassing van deze methode ondersteuning behoeft binnen NOBIS.
- Redoxmetingen worden weinig toegepast bij in situ biorestauratie. Bij intrinsieke biorestauratie worden in plaats van de redox de actuele concentraties van belangrijke elektrondonoren en acceptoren (redox-actieve verbindingen) gebruikt. Deze concentraties leveren naast een vrij gevoelige indicatie over de redoxtoestand en prevalentie van redoxreactie ook kwantitatieve gegevens op over de biodegradatie. Redoxmetingen zelf doen dit niet. Daarom lijken redoxmetingen geschikt als indicatieve meting voor de heersende procescondities in de bodem, maar als kwantitatief monitoringsinstrument bij in situ biorestauratie zijn analyses van redoxintermediären meer geschikt.
- Er zijn geen goed toegankelijke protocollen voor anaërobe sampling. Deze protocollen zijn in het buitenland of bij instituten wel aanwezig en moeten worden geïnventariseerd en beschikbaar komen voor NOBIS-projecten.
- Detectie van unieke biodegradatieproducten kan in speciale gevallen (dechlorering, xenobiotica) een zeer specifiek en bruikbaar monitoringsinstrument zijn. Documentatie is aanwezig, maar deze methoden worden in Nederland (waarschijnlijk) niet veel toegepast.
- Er is weinig ervaring met het gebruiken van selectieve afbraak van makkelijk afbreekbare componenten in vergelijking met moeilijk afbreekbare componenten als monitoringsinstrument, hetgeen bij met name biodegradatie van minerale olie nuttig kan zijn.
- Monitoring op basis van temperatuurverhoging in het bodempakket heeft nauwelijks plaats en is op dit moment nog indicatief en niet kwantitatief voor biodegradatie.
- De meest gebruikte techniek voor het bepalen van het aantal levende bacteriën is de cultuurmethode met agarplaten (uitplaatmethode). Deze methode is alleen geschikt voor totaal tellingen en niet voor het tellen van specifieke organismen. Wanneer een voedingsmedium (zonder agar) wordt gebruikt, wordt gesproken van de MPN-methode (Most Probable Number). Hierbij kunnen wel specifieke bacteriën worden geteld (b.v. benzeenafbrekers). Deze methode is statistisch onderbouwd en wordt af en toe toegepast bij karakterisatie en monitoring van in situ biorestauratieprojecten.
- Enzymassays voor het bepalen van biologische activiteit worden slechts sporadisch toegepast bij in situ biorestauratie. Deze metingen zijn indicatief en wellicht kwantitatief voor biodegradatie. Er is meer ervaring nodig met deze methoden voor het opbouwen van een referentiekader ten behoeve van data-interpretatie.
- Er is zeer weinig tot geen ervaring met het toepassen van moleculaire technieken voor specifieke detectie van micro-organismen. Deze zijn indicatief voor biodegradatie en zijn in specifieke gevallen nuttig, zoals bij het aantonen van aërobe dechlorering, anaërobe dechlorering en afbraak van xenobiotica.

- Er is zeer weinig ervaring met het toepassen van toxiciteitstests bij bodemsanering in Nederland. Deze tests kunnen informatie opleveren over de actuele risico's van de vervuiling en worden gebruikt bij monitoring en eindresultaatbeoordeling, en kunnen daarom een nuttig instrument zijn voor het bepalen van het milieurendement van de sanering.
  - Tellingen van secundaire populaties zijn wel bekend uit de bodemkunde, maar worden niet toegepast in de bodemsanering. Deze metingen zijn indicatief voor biorestauratie en zijn geschikt als kwalitatief monitoringsinstrument.
  - Monitoringsstrategie is een nog relatief onontgonnen terrein, waarbij nog moet worden vastgesteld:
    - .welke parameters wanneer in het monitoringspakket moeten worden opgenomen;
    - .met welke frequentie deze parameters moeten worden gemeten, afhankelijk van het stadium (begin, midden, eind) van de sanering.
- De parameters moeten bij voorkeur in situ worden gemeten. Dit is tot nu toe echter alleen mogelijk voor de pH, redox, temperatuur en O<sub>2</sub>.

#### *Aanbevelingen*

- Inventariseren en uitgeven van protocollen voor anaërobe sampling ten behoeve van actieve en intrinsieke biorestauratie.
- In situ metingen stimuleren van O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> en eventueel temperatuur.
- Voor de overige parameters de nadruk leggen op monsternameprocedures en on/off site analyse.
- Stimuleren van het uitvoeren van monitoring aan redox-actieve verbindingen (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, Fe(II), Fe(III), Mn(II), Mn(IV), SO<sub>4</sub>, S<sup>2-</sup>, CH<sub>4</sub>) als deze relevant zijn voor het saneringsconcept.
- Toegepast onderzoek stimuleren naar biologische monitoring: detectie specifieke bacteriën, secundaire populaties, enzymassays.
- Afhankelijk van de verontreiniging detectie van intermediären stimuleren: met name lager gechloroerde en volledig gedechloroerde componenten.
- Uitgebreid en intensief monitoren van proef- en praktijksaneringen en data interpreteren en vergelijken met vooronderzoek en andere saneringen, en op grond hiervan komen tot een minimaal vereiste monitoringsstrategie.
- In kaart brengen van een optimale monitoringsstrategie.

#### 4.6 Literatuur

- Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**
1. Mu en Scow, 1994, Effect of trichloroethylene (TCE) and toluene concentrations on TCE and toluene biodegradation and the population density of TCE and toluene degraders in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2661-2665.
  2. Wilson et al., Natural bioreclamation of alkylbenzenes (BTEX) from a gasoline spill in methanogenic groundwater. *Hydrocarbon Bioremediation*, p. 202-218, CRC Press Inc.
  3. Acton en Barker, 1992, In situ biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *J. Cont. Hydrol.* 9: 325-352.
  4. Thierrin et al., 1993, Natural degradation rates of BTEX compounds and naphthalene in a sulphate reducing groundwater environment. *Hydrol. Sciences J.* 38: 309-322.
  5. Semprini et al., 1990, A field evaluation of in-situ biodegradation of chlorinated ethenes: part 2, results of biostimulation and biotransformation experiments. *Ground Water* 28: 715-727.
  6. Hutchins et al., 1995, In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 123-131, Batelle press Columbus USA.
  7. Weymann et al., 1995, In: *In situ Aeration: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 167-175, Batelle press Columbus USA.
  8. Peyton et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 111-116, Batelle press Columbus USA.
  9. Smith en Ferguson, In situ remediation using anaerobic biotransformation of groundwater contaminated with chlorinated solvents. *Bioremediation of chlorinated and PAH Compounds*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 320-326, CRC Press Inc.

10. Gerritse, J., Rijksuniversiteit Groningen, persoonlijke mededeling.
11. Gersberg et al., 1995, Biomonitoring of toxicity reduction during *in situ* bioremediation of monoaromatic compounds in groundwater. *Wat. Res.* 29: 545-550.
12. Fries et al., 1994, Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2802-2810.
13. Vail, 1991, Refiner biodegrades separator-type sludge to BDAT standards. *Oil and Gas J.* 11: 53-57.
14. Beller et al., 1995, Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of *in situ* bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2864-2870.
15. Nelson et al., 1993, In: *In situ Bioremediation*. p. 63-90, National Academy Press, Washington, USA.
16. Gemperline et al., 1995, In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 81-87, Batelle press Columbus USA.
17. Hutchins et al., 1995, In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 143-153, Batelle press Columbus USA.
18. Shulz-Berendt et al., 1995, In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 219-224, Batelle press Columbus USA.
19. Johnson et al., 1995, In: *In situ Aeroation: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 1-20, Batelle press Columbus USA.
20. Aelion et al., 1995, In: *In situ Aeroation: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 127-134, Batelle press Columbus USA.
21. Brown et al., 1995, In: *In situ Aeroation: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 185-190, Batelle press Columbus USA.
22. Leeson et al., 1995, In: *In situ Aeroation: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 223-235, Batelle press Columbus USA.
23. Walker en Walker, 1995, In: *In situ Aeration: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 535-541, Batelle press Columbus USA.
24. Lawrence et al., 1995, In: *In situ Aeroation: Air Sparging, Bioventing and related Remediation Processes*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 581-592, Batelle press Columbus USA.
25. Odom et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 17-24, Batelle press Columbus USA.
26. Brockman et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 99-109, Batelle press Columbus USA.
27. Lee et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 147-151, Batelle press Columbus USA.
28. Peck et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 221-227, Batelle press Columbus USA.
29. Pfiffner et al., 1995, In: *Bioremediation of Chlorinated Solvents*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 263-271, Batelle press Columbus USA.
30. Brockman, 1995, In: *Monitoring and Verification of bioremediation*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 39-47, Batelle press Columbus USA.
31. Pinkart et al., 1995, In: *Monitoring and Verification of bioremediation*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 49-57, Batelle press Columbus USA.
32. Benson et al., 1995, In: *Monitoring and Verification of bioremediation*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 105-113, Batelle press Columbus USA.
33. Li, 1995, In: *Monitoring and Verification of bioremediation*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 115-126, Batelle press Columbus USA.
34. Persson et al., 1995, In: *Monitoring and Verification of bioremediation*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 147-155, Batelle press Columbus USA.
35. Davis et al., 1995, In: *Monitoring and Verification of bioremediation*. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 193-201, Batelle press Columbus USA.



36. Van de Velde et al., 1995, In: Monitoring and Verification of bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 241-257, Batelle press Columbus USA.
37. Hinchee en Ong, 1992. J. Air Waste Manage. Assoc. 42: 1305-1312.
38. Smith et al., 1991. J. Contam. Hydrol. 7: 285-300.
39. Kampbell en Wilson, 1991, Bioventing to treat fuel spills from underground storage tanks. J. Hazardous Materials, 28: 75-80.
40. Bochem et al., 1992, In: Soil Decontamination Using Biological Processes. Ed. DECHEMA, VAAM and EFB, p. 859-865, DECHEMA, Frankfurt am Main, Germany.
41. Madsen et al., 1991, In situ biodegradation: microbiological patterns in a contaminated aquifer. Science 252: 830-833.
42. Batterman et al., 1995, In: Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 155-164, Batelle press Columbus USA.
43. Rifai et al., 1995, In: Intrinsic Bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 1-29, Batelle press Columbus USA.
44. Wiedemeier et al., 1995, In: Intrinsic Bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 31-51, Batelle press Columbus USA.
45. Troy et al., 1995, In: Intrinsic Bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 85-90, Batelle press Columbus USA.
46. Toze et al., 1995, In: Intrinsic Bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 117-125, Batelle press Columbus USA.
47. Lee et al., 1995, In: Intrinsic Bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 205-222, Batelle press Columbus USA.
48. Buchanan et al., 1995, In: Intrinsic Bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 245-252, Batelle press Columbus USA.
49. Major et al., 1995, In: Intrinsic Bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 197-203, Batelle press Columbus USA.
50. Van der Waarde et al., 1995, In: Monitoring and Verification of bioremediation. Ed. R.E. Hinchee et al., p. 59-63, Batelle press Columbus USA.
51. Bowman et al., 1993, Characterization of the methanotrophic bacterial community present in a trichloroethylene contaminated subsurface groundwater site. App. Environ. Microbiol. 59: 2380-2387.
52. Bartha et al., 1992, In: Soil Decontamination Using Biological Processes. Ed. DECHEMA, VAAM and EFB, p. 168-175, DECHEMA, Frankfurt am Main, Germany.

## BEGRIPPENLIJST

- Elektronacceptor** De verbinding die elektronen ontvangt (en wordt gereduceerd) bij energie producerende oxidatie-reductiereacties die nodig zijn voor de groei van micro-organismen en biorestauratie. De meest gebruikte elektronacceptor bij biorestauratie is zuurstof.
- Elektrondonor** De verbinding die elektronen afstaat (en wordt geoxideerd). Bij biorestauratie is de organische verontreiniging bijna altijd de elektrondonor. Alleen onder anaërobe omstandigheden vormt de gechloreerde verontreiniging de elektronacceptor.
- Oxidatie** Het afstaan van elektronen door een verbinding, zoals een organische verontreiniging. De koppeling van oxidatie en reductie verschaft energie die micro-organismen gebruiken voor groei en reproductie. Vaak (maar niet altijd) leidt oxidatie tot de additie van een zuurstofatoom en/of het verlies van een waterstofatoom.
- Reductie** De overdracht van elektronen naar een verbinding, zoals zuurstof, welke optreedt wanneer een andere verbinding wordt geoxideerd.
- Primaire substraten** De elektrondonor en elektronacceptor die essentieel zijn om micro-organismen te kunnen laten groeien. Deze verbindingen hebben een vergelijkbare functie als voedsel en zuurstof voor de mens.
- Aërobe respiratie** Het proces waarbij micro-organismen zuurstof gebruiken als elektronacceptor.
- Anaërobe respiratie** Het proces waarbij micro-organismen een andere verbinding dan zuurstof gebruiken als elektronacceptor. Gebruikelijke alternatieven zijn nitraat, sulfaat, ijzer en CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> is in dit geval de uiteindelijke (terminale) elektronacceptor en is een intermediair in de anaërobe afbraak van organische componenten.
- Fermentatie** Het proces waarbij micro-organismen een organische verbinding, zowel als elektrondonor als elektronacceptor, gebruiken en deze omzetten in fermentatieproducten, zoals organische zuren, alcoholen, waterstof en kooldioxide.
- Cometabolisme** Een variatie op biodegradatie waarbij micro-organismen een verbinding omzetten zonder dat deze verbinding kan dienen als de primaire energiebron voor de organismen. Om de verontreiniging te kunnen afbreken, moet het organisme beschikken over andere verbindingen (primaire substraten) om op te groeien.
- Reductieve dechlorering** Biodegradatieproces onder zuurstofloze condities waarbij microbiologisch gekatalyseerde reacties ervoor zorgen dat een halogeen atoom (b.v. chloor) wordt vervangen door een waterstofatoom. De reacties resulteren in de netto additie van twee elektronen aan de organische verbinding (reductie). De gechloreerde verbinding treedt in dit geval op als elektronacceptor.

## BIJLAGE B

### KARAKTERISATIE- EN MONITORINGSPARAMETERS

---

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**parameter:doel:

---

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**

bodemprofielhet in kaart brengen van de bodemopbouw (klei, veen, zand);

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**korrelgrootteverdelinghet classificeren van de grond (zand, silt, klei), van belang voor het specifiek oppervlak en de permeabiliteit;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**specifiek oppervlakhet specifiek oppervlak is van belang voor waterretentie en -stroming, Cation Exchange Capacity (CEC), Anion Exchange Capacity (AEC) en het vermogen verontreinigingen te adsorberen;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**porositeitporositeit is van belang voor de permeabiliteit;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**permeabiliteit het bepalen van de water- of luchtdoorlatendheid van het bodempakket;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**dispersie- en adsorptiecoëfficiëntde modelmatige beschrijving van het transport van verontreinigingen door het bodempakket;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**waterniveaumetinghet in kaart brengen van de grondwaterstand en -stroming;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**region of influence (ROI)het bepalen van de grootte van het gebied waarop de persluchtinjectie of bodemluchtexttractie invloed heeft;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**ionisch bindend vermogen (CEC, AEC)het bepalen van de uitwisselingscapaciteit van ionen;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**elektrische geleidbaarheidhet bepalen van de totale hoeveelheid aan ionen in de bodem en het voorkomen van slecht geleidbare verontreiniging, zoals bijvoorbeeld minerale olie;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**droge stofdroge stof is van belang voor de bepaling van het watergehalte van de bodem en om concentraties uit te drukken op "droge stof basis";

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**verontreiniginghet in beeld brengen van de verontreinigingsgraad en -spreiding;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**terminale elektronacceptorenhet in beeld brengen van de van nature aanwezige en/of continu aangevoerde hoeveelheid elektronacceptoren;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**detectie unieke producten biodegradatiehet aantonen van afbraakprocessen;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**detectie intermediaire vorminghet aantonen van afbraakprocessen;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**biomassa bepalingen:

-bacterietellingenhet bepalen van het aantal aanwezige bacteriën;

-detectie specifieke bacteriënhet bepalen van het aantal aanwezige specifieke bacteriën;

-enzymactiviteitsmetingenhet bepalen van de activiteit van de aanwezige populatie micro-organismen;

biomarkershet bepalen van de omvang en samenstelling van de aanwezige populatie micro-organismen;

-secundaire predatorpopulatieshet bepalen van de omvang van de populaties bacterie-etende micro-organismen, om indirect informatie te krijgen over de bacterieproductie ten gevolge van biodegradatie;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**toxiciteitstests:

-bio-assayshet bepalen van de ecotoxiciteit van de grond voor organismen van verschillende trofische niveaus;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**redoxpotentiaalhet bepalen van de redoxtoestand in grond of grondwater;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**pHhet bepalen van de zuurgraad;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**nutriëntenhet bepalen van de van nature aanwezige en/of continu aangevoerde hoeveelheid aan anorganische voedingsstoffen (N, P, S);

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**metalenhet bepalen van de concentratie metalen, van belang voor eventuele toxiciteit;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**(bi)carbonaat, calciethet bepalen van (bi)carbonaat en calcië, van belang voor het bufferend vermogen van het grondpakket;

**Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.**DOC, TOChet bepalen van het mogelijke zuurstofverbruik dat kan optreden in het bodempakket.

---