Deltares

Biologische bodemsanering van chloorethanen

Ontwikkeling saneringstechnologie

Biologische bodemsanering van chloorethanen
Ontwikkeling saneringstechnologie

Auteur(s)
Nanne Hoekstra

Partners
T&K Technology and Knowledge, SNEEK

Deze activiteit is mede gefinancierd door TKI Watertechnologie uit de PPS-innovatie programmasubsidie van het Ministerie van Economische Zaken

Biologische bodemsanering van chloorethanen
Ontwikkeling saneringstechnologie

Opdrachtgever	Topsector Water & Maritiem
Contactpersoon	Thecla Bodewes
Referenties	2018DEL003
Trefwoorden	In-situ bodemsanering, gestimuleerde biologische afbraak, reductieve dechlorering

Documentgegevens	
Versie	1.0
Datum	20-01-2025
Projectnummer	11203245-002
Document ID	11203245-002-BGS-0002
Pagina's	38
Classificatie	
Status	definitief

Auteur(s)		
	Nanne Hoekstra	

Samenvatting

Uit specialistische monitoring bij een bodemsanering blijkt dat door stimulatie met elektronendonor volledige afbraak van chloorethanen mogelijk is. De hoger gechloreerde ethanen kunnen onder optimale condities zelfs relatief snel afbreken, zo bleek uit een experiment met een bioreactor. De afbraak van (mono)chloorethaan (CA) gaat echter langzaam. Waarschijnlijk is een consortium van dechloreerders betrokken bij de afbaak van de chloorethanen. Op basis van de bevindingen in de bioreactor lijkt vooral *Desulfovibrio* nodig voor de afbraak van CA. De bevindingen wijzen er ook op dat, anders dan bij chloorethenenafbraak, sulfaat nodig is voor de omzetting naar het niet-gechloreerde eindproduct. In het veld is de meerwaarde van bio-augmentatie nog beperkt gebleken. De geïnjecteerde organismen handhaafden zich wel, maar verdere groei kon niet worden waargenomen. Het is aannemelijk dat dit ook door sulfaatgebrek wordt veroorzaakt. Het verdient aanbeveling verdere testen met toediening van extra sulfaat uit te voeren.

Inhoud

	Samenvatting	**4**
1	**Inleiding**	**7**
1.1	Algemeen	7
1.2	Technologie	7
1.3	Uitdaging	7
1.4	Oplossing	7
1.5	Doel	8
1.6	Specifieke onderzoeksvragen:	8
1.7	Leeswijzer	8
2	**Achtergrondinformatie**	**9**
2.1	Afbraakroutes	9
2.2	Verontreinigingssituatie op de proeflocatie	9
2.3	Uitgevoerde bodemsaneringsmaatregelen op de proeflocatie	10
2.3.1	Voorgeschiedenis	10
2.3.2	In combinatie met dit onderzoeksproject uitgevoerde saneringswerkzaamheden	11
3	**Uitgevoerde werkzaamheden**	**12**
3.1	Elektronendonorinjecties	12
3.1.1	Op het middenterrein	14
3.1.2	Achterzijde Moba terrein	14
3.1.3	Achter woningen aan de Schimmelpennincklaan	15
3.2	Kweek van chloorethaanafbrekers	15
3.3	Bio-augmentatie	16
3.4	Gehanteerde chemisch-analytische methoden	16
3.5	Monitoring van chloorethaanafbrekers	17
3.5.1	DNA-analyses	17
3.5.2	Ontwikkeling qPCR *Desulfovibrio spp.*	18
3.5.2.1	Literatuurstudie	19
3.5.2.2	Ontwikkeling primerpaar	19
3.5.2.3	*Desulfovibrio* spp. selectie primerset qPCR	19
3.5.2.4	qPCR *Desulfovibrio* spp.	19
4	**Resultaten en discussie**	**21**
4.1	Elektronendonorinjecties	21
4.1.1	Geochemie	21
4.1.2	Verontreinigingen in brongebied	23
4.1.3	Verontreinigingspluim	25
4.2	Kweek van chloorethaanafbrekers	27

4.3 Identificatie van chloorethaanafbrekers op de locatie 32
4.4 Bio-augmentatie 34

5 Evaluatie en conclusies 37

1 Inleiding

1.1 Algemeen

Bij het toepassen van biologische bodemsanering – grond, bodemlucht en met name grondwater – kunnen gewenste natuurlijke processen worden gestimuleerd door de ideale leefomstandigheden te creëren voor de specifieke micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van de aanwezige verontreiniging.

1.2 Technologie

Vaak ontbreekt het van nature in de bodem aan de beschikbaarheid van de juiste voedingsstoffen om een verontreiniging microbiologisch te verwijderen en zijn de redoxcondities niet optimaal. Inmiddels zijn er veel praktijkvoorbeelden waarbij de natuurlijke afbraak wordt gestimuleerd door het toedienen van stoffen die de juiste omstandigheden in de bodem creëren voor afbraak van verontreinigingen. De benodigde stoffen betreffen deels nutriënten maar zijn deels afhankelijk van de aard van de verontreinigingen. Zo zijn voor de microbiologische afbraak van alkanen en vluchtige aromaten uit olie zuurstof en/of nitraat nodig. Chloorkoolwaterstoffen worden juist gebruikt als stof om mee te ademen, terwijl een koolstofhoudende voedingsstof moet worden toegediend om de betreffende microbiële populatie te laten floreren.

1.3 Uitdaging

Omdat vooral voor chloorkoolwaterstoffen de condities in de bodem van nature meestal niet optimaal zijn voor volledige biologische afbraak komen grote pluimen van deze verontreinigende stoffen op heel veel plaatsen in de watervoerende pakketten voor. Met de biologische sanering voor chloorethenen (zoals Per en Tri die in het verleden veelal bij wasserijen in de bodem zijn aangetroffen) door middel van elektronendonorinjectie zijn reeds goede praktijkervaringen opgedaan. Het blijkt echter dat deze maatregelen niet rechtstreeks te vertalen zijn naar de sanering van industriële locaties waar chloorethanen als ontvettingsmiddel zijn gebruikt. De theoretische afbraakwijze van deze stoffen is inmiddels bekend, maar in de praktijk treedt vaak slechts gedeeltelijke afbraak op en vindt accumulatie van het toxische monochloorethaan plaats, dat zich heel gemakkelijk via het grondwater kan verplaatsen. De micro-organismen verantwoordelijk voor de afbraak zijn nog onvoldoende geïdentificeerd. Voor de ontwikkeling van een effectieve saneringsmethode is daarom toegepast wetenschappelijk onderzoek nodig.

1.4 Oplossing

Ideaal daarvoor is een locatie in Barneveld waar een veldproef op volledige schaal met deze saneringswijze al is ingezet en uitgebreide monitoring van de chemische en biologische processen in het grondwater heeft plaatsgevonden. Op deze locatie is het gelukt de grondwaterchemie met elektronendonorinjecties zodanig te beïnvloeden dat chloorethanen volledig worden gedechloreerd. In een eerder TKI project (2014DEL006) was reeds overtuigend bewijs gevonden dat het uit trichloorethaan gevormde intermediair monochloorethaan ook biologisch wordt omgezet tot ethaan.

Het bleek echter lang te duren voordat de noodzakelijke micro-organismen zich tot een populatie ontwikkelen die tot volledige verwijdering van chloorethanen in staat is. Daarnaast was op de proeflocatie de afbraaksnelheid van monochloorethaan naar ethaan nog niet hoog genoeg om de verplaatsing van het grondwater bij te houden. Hierdoor breidde de verontreinigingspluim zich nog steeds uit met de stroming van het grondwater. De afbraak van monochloorethaan moest daarom verder worden gestimuleerd om de omzettingssnelheid te verhogen en accumulatie en verspreiding via de watervoerende bodemlaag te voorkomen. Als extra maatregel, aanvullend op het optimaliseren van de geochemische condities, is daarom ook bio-augmentatie nodig. Gerichte stimulering van biologische afbraak in de bodem door het kweken van de juiste micro-organismen in een bovengrondse waterreactor met injectie in de watervoerende laag is bewezen functioneel voor chloorethenen. In hoeverre deze aanpak voor monochloorethaan en de nog ongeïdentificeerde verantwoordelijke organismen ook werkt, is in dit project onderzocht.

1.5 Doel

Gericht stimuleren van monochloorethaanafbrekende bacteriën en monitoren van de effecten daarvan op de verspreiding van de verontreiniging met het grondwater.

1.6 Specifieke onderzoeksvragen:

1. Welke organismen in de microbiële populatie zijn verantwoordelijk voor de chloorethaanafbraak, en wat zijn de optimale condities van het grondwater (temperatuur, redox, nutriënten, etc.) voor vermeerdering?
2. Kan een chloorethaanafbrekende microbiële populatie in een waterreactor worden opgekweekt, die geschikt is voor bio-augmentatie?
3. Kan door bio-augmentatie (in combinatie met elektronendonorinjectie) de afbraaksnelheid van chloorethanen in het grondwater worden versneld?

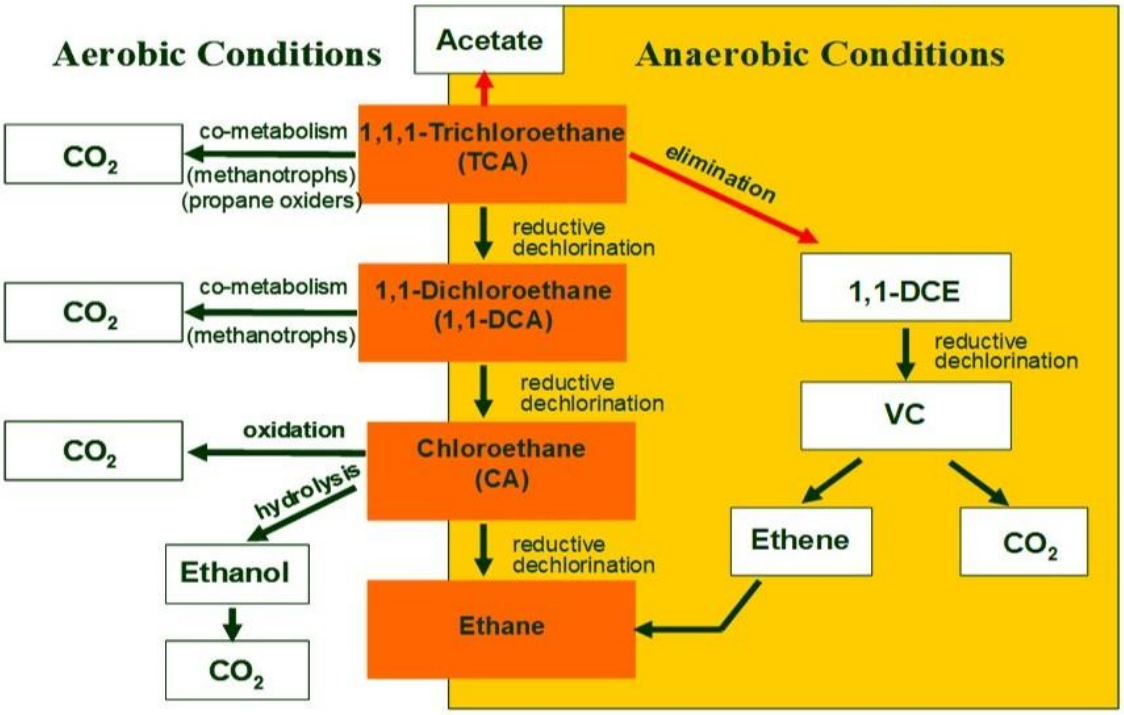
1.7 Leeswijzer

Hoofdstuk 2 bevat achtergrondinformatie, met zowel de stand van de wetenschappelijke kennis over de afbraak van de betreffende verontreinigende stoffen, de bevindingen ten aanzien van de bodemverontreinigingen op de proeflocatie als de totale historie van de bodemsanering ter plaatse. In hoofdstuk 3 zijn de voor specifiek dit project uitgevoerde werkzaamheden beschreven. In hoofdstuk 4 worden de resultaten daarvan gepresenteerd en bediscussieerd. De antwoorden op de in de vorige paragraaf gestelde onderzoeksvragen, ten slotte, staan in hoofdstuk 5.

2 Achtergrondinformatie

2.1 Afbraakroutes

De biologische omzettingen die relevant zijn voor verontreinigingen met chloorethanen zijn weergeven in figuur 2-1. De belangrijkste afbraakroute is de reductieve dechlorering van trichloorethaan (1,1,1-TCA) en dichloorethaan (1,1-DCA) naar (mono-)chloorethaan (CA) en ethaan Vanuit 1,1,1-TCA wordt ook dichlooretheen (1,1-DCE) gevormd, dat afbreekt naar vinylchloride (VC) en etheen. Zoals uit de figuur blijkt, kunnen ook andere biologische en chemische omzettingsprocessen een rol spelen.



Figuur 2-1 Biologische en chemische afbraakroutes van 1,1,1-TCA

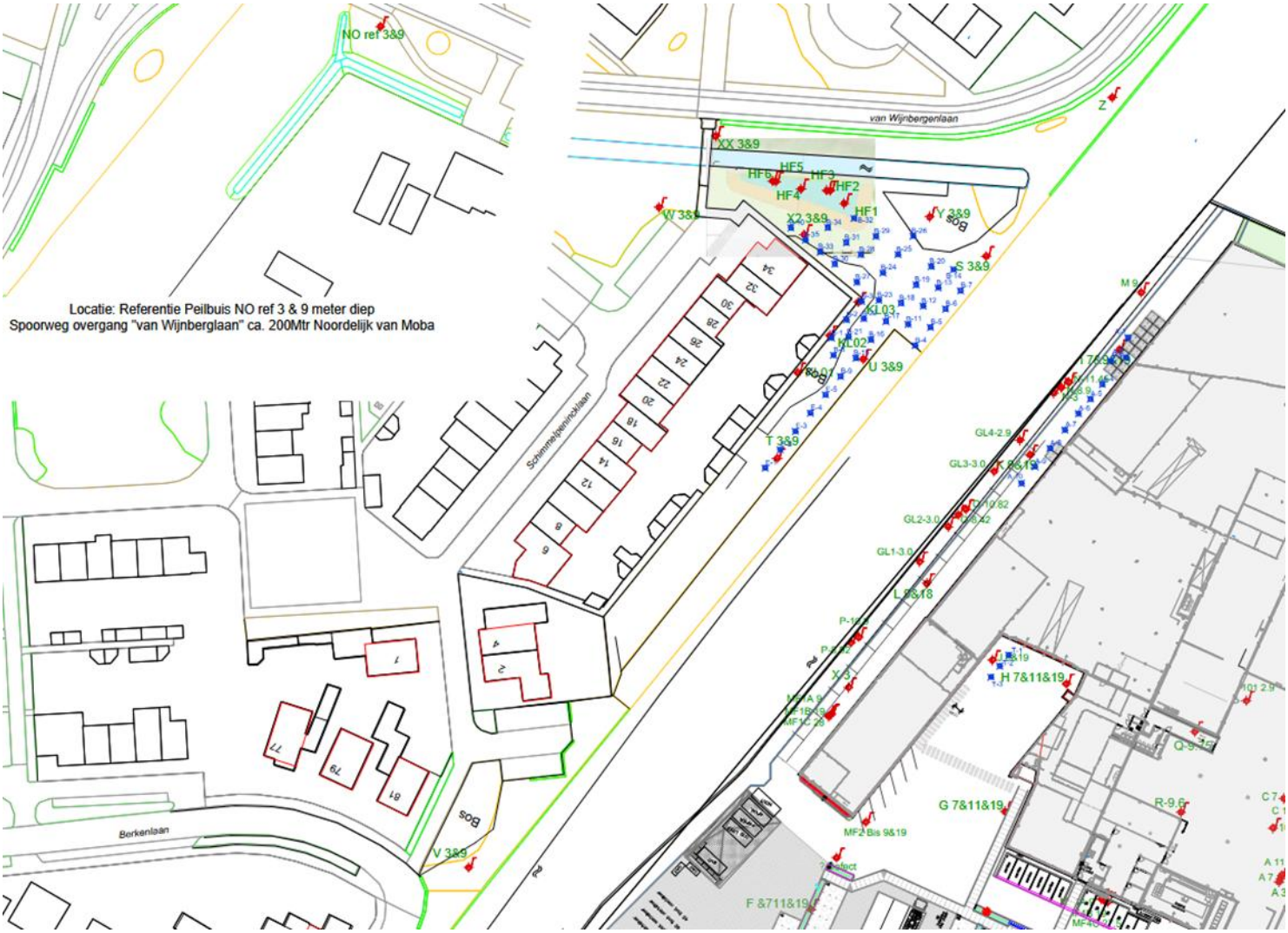
2.2 Verontreinigingssituatie op de proeflocatie

Een overzicht van de proeflocatie met aanwezige peilbuizen is opgenomen als figuur 2-2.

Op de proeflocatie waren in het kerngebied van de in de bodem aangetroffen verontreiniging met ontvettingsmiddel voorafgaand aan de saneringsmaatregelen (zoals vastgesteld bij een meting op 7 januari 2009) naast 1,1,1-TCA (plaatselijk 137 **m**g/l) eveneens hoge concentraties van 1,1 DCA (tot 35 **m**g/l) en CA (1,8 **m**g/l) aanwezig. Ook werd ethaan aangetroffen (maar niet hoger dan circa 150 **µ**g/l). Dit wijst op afbraak via de hierboven vermelde hoofdroute met reductieve afbraak van chloorethanen. Daarnaast werd ook 1,1-DCE aangetroffen (10 **m**g/l), alsmede VC (tot bijna 900 **µ**g/l) en een weinig etheen (20 **µ**g/l). Dat wees er op dat eveneens 1,1 DCE werd gevormd en dat die stof via reductieve dechlorering werd afgebroken. Dat laatste is een bekend proces, dat gestimuleerd kan worden door middel van elektronendonorinjecties.

Of dit ook voor chloorethanen zo werkte, was bij de start van het project nog niet zeker. Met name bestond onzekerheid over de afbraak van CA. Voor deze stof is een (ad hoc) risicogrenswaarde vastgesteld van 579 µg/l; een concentratie die op de proeflocatie ruimschoots wordt overschreden. Bij stagnerende afbraak bestond daarom het gevaar van ongewenst hoge concentraties voorbij de erfgrens, waar een woonwijk is gelegen. Wel vormde de aanwezigheid van ethaan een aanwijzing dat volledige reductieve dechlorering van chloorethanen op natuurlijke wijze plaatsvond, in ieder geval op beperkte schaal.

Ook in de verontreinigingspluim werden echter nog concentraties boven de risicogrenswaarde aangetroffen. Dit wees erop dat de verontreiniging zich sneller verspreidde dan deze werd afgebroken.



Figuur 2-2 Locatie met overzicht peilbuizen

2.3 Uitgevoerde bodemsaneringsmaatregelen op de proeflocatie

2.3.1 Voorgeschiedenis

Daarom werd besloten elektronendonorinjecties toe te passen, analoog aan die welke voor chloorethenen worden toegepast. Hiermee werd gelijk ook de afbraak van de gevormde chloorethenen, met name het toxische en vluchtige VC, gestimuleerd.

Om de bodem op de proeflocatie te saneren, zijn medio februari 2009 in de bron en pluimzone directe injecties van Nutrolase (protamylasse) als leverancier van elektronendonor en nutriënten uitgevoerd om de *in situ* afbraak van deze chloorethanen d.m.v. reductieve dechlorering te stimuleren. Daarmee werd beoogd de biologische afbraak te stimuleren. Uit monitoring in de bron- en pluimzone van de verontreiniging blijkt dat de gewenste afbraak inderdaad plaatsvindt, maar voor de zekerheid zijn in maart 2016 in de pluimzone aanvullende injecties uitgevoerd om verspreiding over de terreingrens te voorkomen. In januari 2019 is gebruik gemaakt van de gelegenheid van het door verbouwingen bereikbaar komen van de bodem nabij het brongebied om daar aanvullend elektronendonor te doseren. Verdere injecties in het brongebied waren inmiddels niet goed meer te combineren met de bedrijfsprocessen.

2.3.2 In combinatie met dit onderzoeksproject uitgevoerde saneringswerkzaamheden

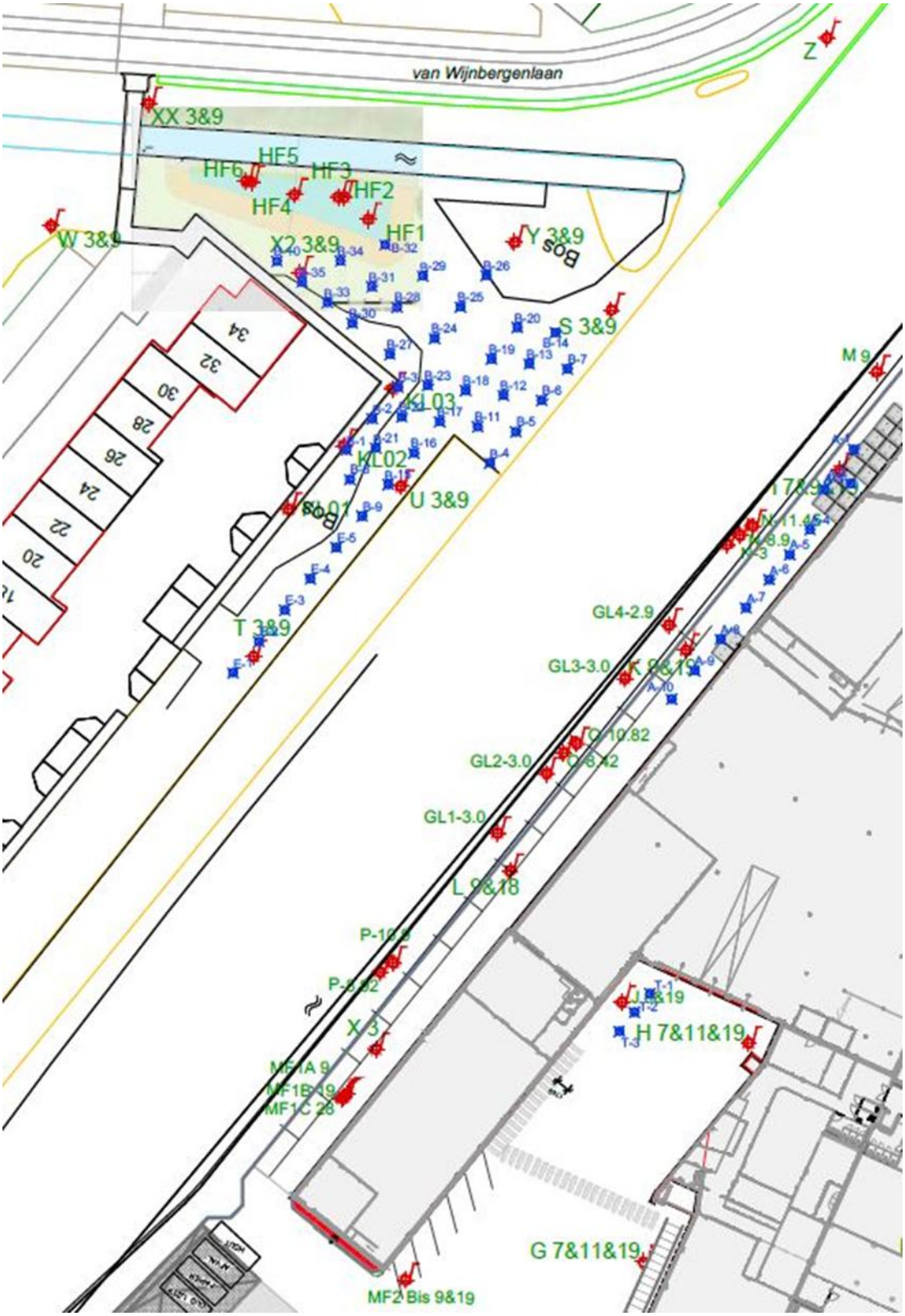
Toen de substraatinjecties voor de volledige afbraak van de chloorethanen wel enig maar toch nog onvoldoende effect leek te sorteren, werd bio-augmentatie met chloorethaanafbrekers relevant. Probleem was echter dat het organisme dat CA afbreekt niet bekend was. Wel leek het mogelijk dit organisme te kweken, uitgaande van materiaal uit de verontreinigingskern op de locatie. Bij het kweken in een reactor is geprobeerd het betreffende organisme te identificeren.

Vervolgens is, bij een laatste ronde van elektronendonordoseringen, waarbij naast protamylasse sojaolie is geïnjecteerd voor een langduriger werking, bio-augmentatie met de kweek uitgevoerd. Dit is gebeurd in een peilbuis op het middenterrein, tussen het brongebied van de verontreiniging en de perceelgrens, waar de hoogste concentratie aan chloorethaan werd aangetroffen. Bovendien stegen de concentraties hier in het laatste jaar en bevonden ze zich boven risicogrenswaarde. Aan de perceelgrens zijn de chloorethaanconcentraties lager; hier is alleen een elektronendonordosering met het bovengenoemde mengsel uitgevoerd. Buiten het bedrijfsterrein is primair geïnjecteerd ten behoeve van een vinylchloridepluim, die zich stroomafwaarts van het perceel had verspreid. Wel is hier in twee peilbuizen met significante chloorethaanconcentraties eveneens kweekmateriaal toegediend.

3 Uitgevoerde werkzaamheden

3.1 Elektronendonorinjecties

In de periode van 29 augustus t/m 26 september 2022 heeft T&K Service B.V. op het bedrijfsterrein van MOBA aan de Stationsweg 117 en achter de woningen aan de Schimmelpenincklaan opnieuw directe bodeminjecties uitgevoerd, omdat de verontreiniging de perceelgrens bleek te overschrijden. Figuur 3-1 toont een overzicht van de injecties. Gestart is met een mini sondeercrawler op injectiepunt T3. Deze boorwagen kon met 9 ton niet dieper drukken dan 7 m diepte. Om het werk volgens plan uit te voeren is een CompactRotoSonic boorwagen aangevoerd. Deze crs-boorwagen heeft de injecties T1, T2, T3 en A10, A9, A8 en A7 uitgevoerd. Door het grote boorvermogen van de crs en een constructiefout in de overgang van de boorkop naar de injectiebuis was er meermalen een breuk in het overgangsstuk waardoor de uitvoering stagneerde. De resterende bodeminjecties zijn derhalve uitgevoerd met een sonische boorwagen. De registraties van de crs-boorwagen zijn handmatig bijgehouden op injectieformulieren, die zijn opgenomen in het ‘Evaluatieverslag deelsanering omgeving Stationsweg 117 Barneveld (GE020300234) - Bodemsanering t.b.v. perceelgrensoverschrijdende verontreiniging bij Schimmelpennincklaan’ (Deltares, augustus 2024). De sonische boorwagen was voorzien van een *programmable logic controller* (plc) die automatisch de registraties bijhoudt.



Figuur 3-1 Locatie met overzicht injectiepunten

3.1.1 Op het middenterrein

Bij peilbuis J, op het middenterrein, zijn 3 top down bodeminjecties, genummerd T1, T2 en T3, uitgevoerd. Vanaf 2 m is per m tot 10 m diep 50 liter substraatgeïnjecteerd. Na het injecteren is het boorgat afgedicht met cebo gel qse. Per boring is 1 zak verbruikt. Het substraat is in kuubvaten aangemaakt uit 800 liter protamylasse en 200 liter soja-olie. Per boring is 450 liter substraat geïnjecteerd. Zie figuur 3-2 voor een impressie.

Figuur 3-2 Injecties bij peilbuis J op het middenterrein

3.1.2 Achterzijde Moba terrein

Aan de achterzijde van het MOBA-terrein, langs het spoor, zijn 10 top down injecties, genummerd A 1 t/m A10, uitgevoerd. Vanaf 2 m is per m tot 11 m diep 50 liter substraat geïnjecteerd. Na het injecteren is het boorgat afgedicht met cebo gel qse. Per boring is 1 zak verbruikt. Het substraat is in kuub vaten aangemaakt uit 800 liter protamylasse en 200 liter sojaolie. Per boring is 500 liter substraat geïnjecteerd. Zie figuur 3-3 voor een impressie.

Figuur 3-3 Injecties aan de achterzijde van het MOBA-terrein, langs het spoor

3.1.3 Achter woningen aan de Schimmelpennincklaan

Achter woningen aan de Schimmelpennincklaan zijn 35 top down injecties, genummerd B1 t/m B35, uitgevoerd. Vanaf 2 m is per m tot 5 m diep 100 liter substraat geïnjecteerd. Na het injecteren is het boorgat afgedicht met cebo gel qse. Per boring is 1/3 zak gebruikt. Het substraat is in kuubvaten aangemaakt uit 200 liter protamylasse, 35 liter sojaolie, 1 liter kweek voor de biologische afbraak van chloorethenen en 765 liter leidingwater. Per boring is 400 liter substraat geïnjecteerd.

Aanvullend zijn 5 extra top down injecties E1 t/m E5 uitgevoerd. Vanaf 2 m is per m tot 10 m diep 50 liter substraat geïnjecteerd. Na het injecteren is het boorgat afgedicht met cebo gel qse. Per boring is 1 zak verbruikt. Het substraat is in kuubvaten aangemaakt uit 800 liter protamylasse en 200 liter sojaolie. Per boring is 450 liter substraat geïnjecteerd.

Zie figuur 3-4 voor een impressie.

Figuur 3-4 Injecties achter de woningen aan de Schimmelpennincklaan

3.2 Kweek van chloorethaanafbrekers

Kweekmateriaal is verzameld uit peilbuis 103 in het kerngebied van de verontreiniging en nabij de plaats waar eerder substraat was geïnjecteerd omdat uit de monitoring bleek dat ter hier omzetting van hoger naar lager gechloreerde ethanen plaatsvond en ook ethaanvorming op gang leek te komen. Circa 1.000 liter grondwater is rechtstreeks uit de peilbuis in een reactor gepompt. Op basis van monitoringsresultaten is aan de reactor herhaaldelijk 2 liter protamylasse toegevoegd en wel op 22-11-2021, 11-6-2022 en 29-7 2022. Daarnaast is een sulfaatdosering uitgevoerd op 25-6-2022.

3.3 Bio-augmentatie

Na het injecteren van elektrondonor is voor verdere stimulering van de biologische afbraak van met name monochloorethaan de gekweekte biomassa geïnfiltreerd in de peilbuizen:

- J op 9 m -mv, 500 liter gekweekte biomassa;
- T op 9 m -mv 300 liter en op 3 m 100 liter materiaal uit de bioreactor (verdund met 500 liter grondwater uit J9);
- KL03 op 3 m -mv 100 liter materiaal uit de bioreactor (verdund met 500 liter grondwater uit J9).

Figuur 3-5 Bio-augmentatie van chloorethanenafbrekers, rechtstreeks uit de reactor

De biomassa met afbrekers van chloorethanen is rechtstreeks vanuit de reactor in de peilbuizen gepompt, zie figuur 3-5. Dit wijkt af van de toedieningsmethode van gekweekte afbrekers van chloorethenen, die in de verontreiningspluim eveneens zijn toegediend om de afbraak van 1,2-dichlooretheen en vinylchloride te helpen bespoedigen (zie § 3.1). De reden is dat er nog geen ervaring is met kweekmateriaal van choorethanenafbrekers. Omdat niet bekend is hoe kwetsbaar de kweek is, is deze niet gemengd met substraat, maar separaat rechtstreeks uit de bioreactor in de peilbuizen gepompt. Voorafgaand hieraan waren door de substraatinfiltraties de bodemcondities eerst geoptimaliseerd voor dechloreerders. Nadeel van deze behoedzame methode is wel dat in de bodem nog menging moet plaatsvinden.

3.4 Gehanteerde chemisch-analytische methoden

In het veld is met een slangenpomp en doorstroomcel met sensoren het zuurstofgehalte, de geleidbaarheid, de pH, de redoxpotentiaal en de temperatuur van het grondwater gemeten.

Anionen, kationen, en organisch koolstof (DOC) in veld- en bioreactormonsters zijn in het laboratorium van Deltares geanalyseerd.

Anionen- en kationenanalyses zijn uitgevoerd op een IC (Ionen Chromatografie) van door 0,45 µm poriegrootte gefiltreerde vloeistofmonsters. De analyses zijn uitgevoerd op een Dionex ICS 6000 systeem van Thermo Scientific. Kalibraties zijn uitgevoerd met behulp van standaard oplossingen van Inorganic Ventures.

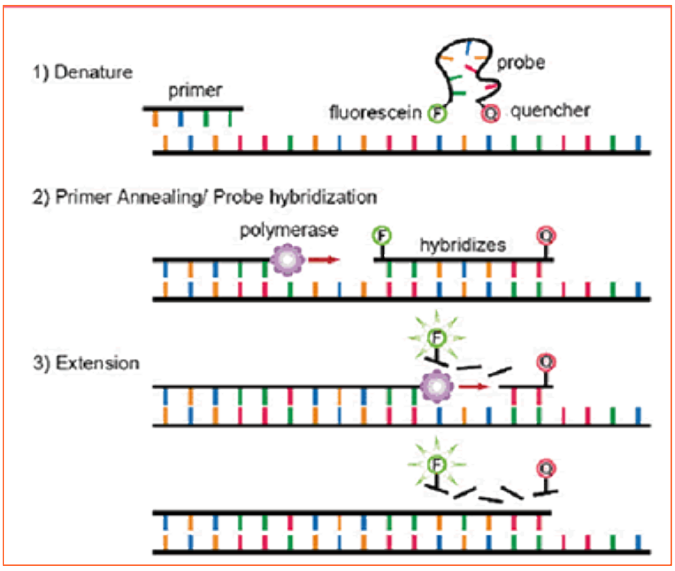
Analyse op organische koolstof is uitgevoerd middels een non-purgeable organic carbon analyse in met 0,45 µm poriegrootte gefiltreerde vloeistofmonsters op een Shimadzu TOC-L systeem. Elk monster is gemeten in een totaalvolume van 18 ml, aangezuurd met 0,18 ml 2M HCL. Kalibraties zijn verricht met standaardoplossingen van Reagecon.

Deze methoden zijn zowel toegepast op grondwatermonsters uit het veld als op monsters uit de bioreactor.

3.5 Monitoring van chloorethaanafbrekers

3.5.1 DNA-analyses

Bacteriën kunnen vaak worden geïdentificeerd aan de hand van het soortspecifieke 16S rRNA-gen. Met behulp van specifieke primers - een aantal baseparen die begin en eind van het te detecteren stuk DNA markeren - wordt het deel van de genen geamplificeerd dat karakteristiek is voor dechloreerders. De amplificatie is gebaseerd op een enzymatische reactie waarbij de DNA-strengen zich splitsen en vervolgens verdubbelen: de Polymerase Chain Reaction (PCR). Het geamplificeerde DNA kan worden gekwantificeerd door binding met een fluorescent label: de probe. Dit principe is schematisch weergegeven in figuur 3-6.



Figuur 3-6: Principe gendetectie. Het te detecteren deel van het DNA verdubbelt zich met behulp van een specifieke primer en kwantificeren is mogelijk met een probe die een fluorescent signaal afgeeft bij inbouw in het molecuul.

De analyse wordt uitgevoerd in een zogeheten real-time PCR-apparaat. De toename van fluorescentie wordt continu gemeten en is een maat voor de concentratie van het in het oorspronkelijke monster aanwezige specifieke DNA. Het apparaat wordt hierbij gekalibreerd met standaarden met bekende hoeveelheden DNA.

Voor het uitvoeren van qPCR, met kwantificatie van de aanwezige genen, is DNA geïsoleerd uit het de verschillende grondwatermonsters. De bemonstering van grondwater voor DNA-analyses is anaeroob en steriel uitgevoerd en het materiaal is direct na bemonstering bij 4ºC bewaard. De DNA-monsters zijn binnen 24 uur in het laboratorium gefiltreerd over een membraanfilter met 0,22 µm poriegrootte door middel van een millipore vacuüm filtratie systeem. Het filter is vervolgens gebruikt voor DNA-isolatie met behulp van de Qiagen Powerlyzer DNA kit. De PCR-analyses zijn uitgevoerd op de C1000-CFX96 van Bio-rad, waarbij genkopieën zijn gekwantificeerd.

Primers zijn al langer beschikbaar voor 16S-rRNA genen van bekende dechlorerende micro-organismen zoals *Dehalococcoides* en *Dehalobacter*. Van het eerste genus is bekend dat deze choorethenen reductief volledig kunnen afbreken. Het tweede genus kan tetra- en trichlooretheen afbreken maar ook 1,2-dichloorethaan, door bezit van het gen alkaandehalogenase (dhlA). Het vermoeden bestond dat dit genus ook andere chloorethanen zou kunnen afbreken. Verder zijn VC-reductasegenen interessant, omdat met de enzymen waarvoor deze coderen mogelijk tevens het vergelijkbare CA kan worden afgebroken. Beschikbaar zijn primers voor twee reductasen, namelijk vcrA en bvcA. Daarnaast zijn primers voor EaCoMT, dat ook etnE wordt genoemd, beschikbaar, een gen dat codeert voor een enzym dat VC aeroob afbreekt. Ook dit gen kwam in aanmerking voor een rol bij CA-afbraak op de locatie.

qPCR's voor specifiek DNA van bovengenoemde bacteriën en enzymen zijn zowel uitgevoerd op veldmonsters als op monsters van het kweekmateriaal.

Naast kwantitatieve analyse van specifieke genen is kwalitatieve analyse mogelijk van het totale genoom van organismen, door middel van het bepalen van de volgorde van de nucleotiden waaruit het DNA is opgebouwd: het zogeheten sequencen. Rond het jaar 2000 werden nieuwe methoden van DNA-sequencing ontwikkeld die sneller dan ooit tevoren de DNA-code konden ontcijferen. Deze methoden werden *next-generation sequencing* (NGS) of *high-throughput sequencing* genoemd, om hen te onderscheiden van de conventionelere methoden, zoals Sanger sequencing. In tegenstelling tot *first-generation sequencing*, konden next-generation-technieken het gehele genoom van een organisme in één keer sequencen. Hiervoor wordt het DNA eerst gefragmenteerd. Van gevormde kleine stukken wordt de nucleotidevolgorde bepaald door middel van verschillende geautomatiseerde sequence-methoden. Via overlappende sequenties kan het gehele genoom worden gereconstrueerd.

Door middel van NGS is in het kweekmateriaal gekeken naar de totale populatie bacteriën op genus-niveau. Omdat het genus *Desulfovibrio* domineerde in het kweekmateriaal hebben we daarvoor een nieuwe qPCR-methode is ontwikkeld; zie de volgende paragraaf.

3.5.2 Ontwikkeling qPCR *Desulfovibrio spp.*

Verschillende mogelijkheden voor detectie van *Desulfovibrio* spp. zijn verkend. Als eerste is gezocht naar bestaande (q)PCR primers in de wetenschappelijke literatuur. Ook is gekeken of het mogelijk was om een primerpaar te ontwikkelen. Hiervoor is gebuikt gemaakt van de genetische databank van NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) en van de aanwezige *Desulfovibrio* DNA sequenties van de reactor zelf. Van de gekozen sequenties werd met behulp van de webserver van Clustal Omega (v1.2.4) een multiple sequentie alignment gemaakt. Wanneer geconserveerde stukken in het DNA zaten konden specifieke PCR primers worden ontworpen, gebruik makend van de NCBI primer design tool. Dit programma gebruikt Primer3 om PCR primers te ontwerpen en vervolgens BLAST in het globale uitlijningsalgoritme om primers te screenen tegen de database en het waterdier specifieke hoogste bekende taxon. Dit laatste om primerparen te vermijden die niet specifieke amplificaties kunnen veroorzaken. De NCBI primer design tool geeft een top 10 van best geschikte primerparen. Vorming van primer-dimers (bijproducten) voor de voorgestelde primers zal in de praktijk nog moeten worden getest.

Voor de ontwikkeling van het ideale primerpaar is rekening gehouden met de volgende karakteristieken:

1. Smelttemperatuur tussen de 55 en 65˚C
2. 40-60% G-C concentratie
3. Primer lengte van 18-30 basen
4. Primerpaar moet geen complementaire regio's hebben
5. Totale amplicon lengte van 70-300 baseparen

3.5.2.1 Literatuurstudie

In de literatuur is een PCR-primerset beschreven, die *Desulfovibrio* spp. identificeert in slijmvlies en fecale monsters (Fité et al.). Deze is verder ontwikkeld en getest voor qPCR-analyse. Dit zijn DSV691-F (5'-CCGTAGATATCTGGAGGAACATCAG-3') en DSV826-R (5'-ACATCTAGCATCCATCGTTACAGC-3').

3.5.2.2 Ontwikkeling primerpaar

Allereerst is er gekeken naar de aanwezige *Desulfovibrio*-DNA-sequenties uit de reactor zelf. Hieruit blijkt dat de nucleotiden die hetzelfde zijn voor deze verschillende sequenties, helaas niet uniek zijn. Dit betekent dat als hiervoor primers ontwikkeld worden op dit gedeelte van de sequentie ook andere soorten naast *Desulfovibrio* spp. gedetecteerd kunnen worden en daarom geen optie om verder mee te werken.

Vervolgens is er gekeken naar de sequenties die aanwezig zijn in de databank van NCBI. En is op basis hiervan en rekening houdend met de benodigde karakteristieken voor een ideale primerset, de volgende primerset samengesteld. Dit is DSV408-F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATA-3') en DSV594-R (5'-TCTACGGATTTCACTCCTACACC-3'). Deze is verder getest voor qPCR analyse.

3.5.2.3 *Desulfovibrio* spp. selectie primerset qPCR

Voor het uitvoeren en verder uittesten van de twee geselecteerde primersets, is eerst een selectie gemaakt van verschillende monsters waarmee geprobeerd is *Desulfovibrio* te detecteren. Hierbij zijn respectievelijk primerset 1: DSV691F/DSV8260R en primerset 2: DSV408-F/DSV594-R getest. Op basis van deze resultaten kwam duidelijk naar voren dat primerset 2 niet specifiek genoeg was en op alle geanalyseerde veldmonsters een positief resultaat gaf. Primerset 1 gaf een veel specifieker beeld, dat zich ook liet herhalen in de triplo's. De positieve en negatieve controles gaven ook het juiste beeld terug. Op basis van deze resultaten is besloten om verder te gaan met primerset 1.

3.5.2.4 qPCR *Desulfovibrio* spp.

Voor de kalibratielijn is gekozen een 16SrRNA fragment van *Desulfovibrio* te cloneren in een TOPOvector van Thermofisher, volgens TA TOPO cloning kit. De uitgevoerde klonering is positief bevestigd door te sequencen en vervolgens te blasten bij de NCBI databank.

De qPCR is uitgevoerd op een C1000 Touch thermal cycler uitgerust met een CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories B.V.). Er is gebruik gemaakt van 96-well optical platen. De gebruikte reagentia voor alle PCRs was als volgt: 12,5 µL iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 6,5 µL DNA-free MiliQ, 1,5 µL forward primer (10 pmol/µl), 1,5 µL reverse primer (10 pmol/µl) en 3 µL DNA. Voor de negatieve controle was het DNA vervangen door DNA-free MiliQ. Detectie is uitgevoerd per monster, met onverdund en 10x verdund DNA. Nadat de optimalisatie van het thermische programma had plaatsgevonden zijn de verschillende samples gedraaid. Daarna is separaat de kalibralielijn opgezet in een aparte run, in een achtvoudige seriële verdunning van $2,74 * 10^7$ tot en met $2,74 * 10^0$ genkopieën/µL.

Het thermische programma voor detectie van de organismen bestond uit; initiële denaturatie stap op 94°C voor 3 min, denaturatie voor 60 sec op 94°C, gevolgd door annealing stap op 62°C voor 60 sec en een elongatie stap op 72°C voor 45 sec. In totaal werden er 35 cycli gedraaid. Vervolgens werd er een meltcurve gemaakt door; 5 min op 72°C, 95°C voor 1 min, 62°C voor 1 min, meltcurve van 62°C tot en met 90°C met stappen van 0,5°C per 10 seconden.

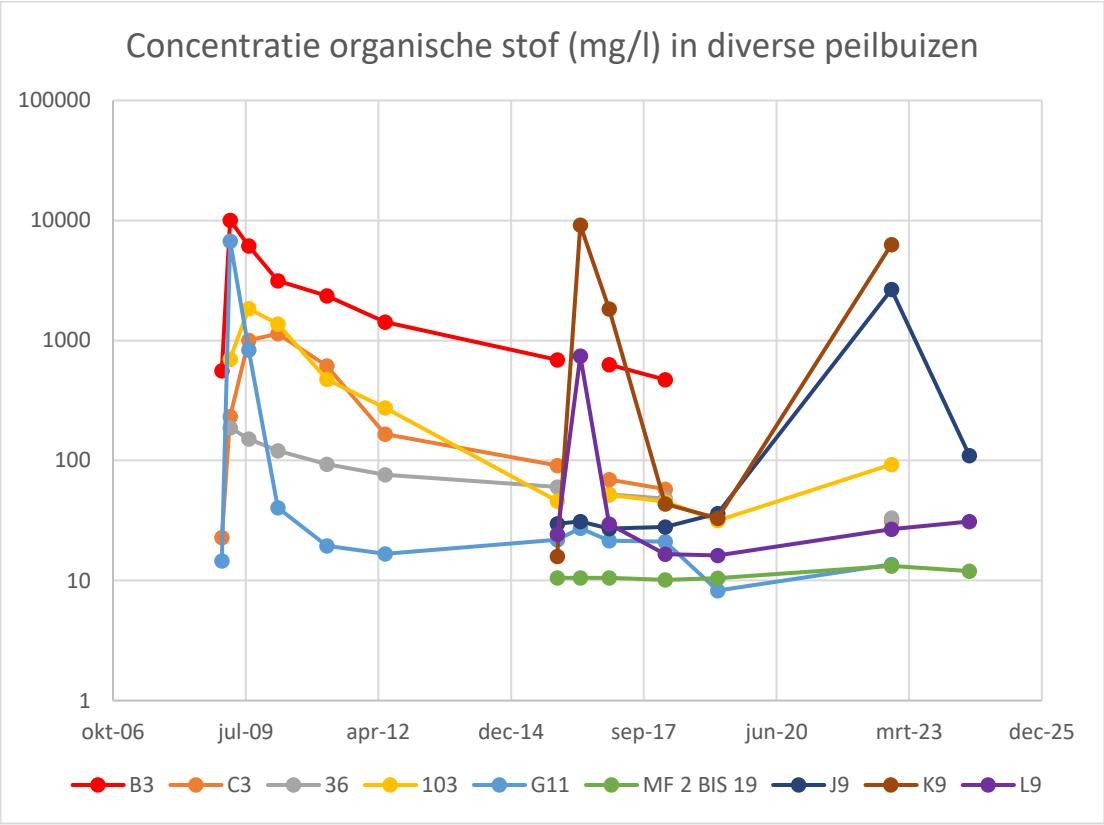
4 Resultaten en discussie

4.1 Elektronendonorinjecties

Een overzicht van alle analyseresultaten is opgenomen in het Evaluatieverslag deelsanering omgeving Stationsweg 117 Barneveld (Deltares, december 2012). Van representatieve peilbuizen zijn grafieken gemaakt. Hierbij zijn uitschieters soms verwijderd. Dit geldt met name voor onevenredig hoge chloorethaanconcentraties die begin 2017 in vrijwel alle peilbuizen zijn gemeten. Dit betreft waarschijnlijk een analysefout.

4.1.1 Geochemie

Figuur 4-1 toont voor een selectie uit de peilbuizen het verloop van de concentratie organische stof.

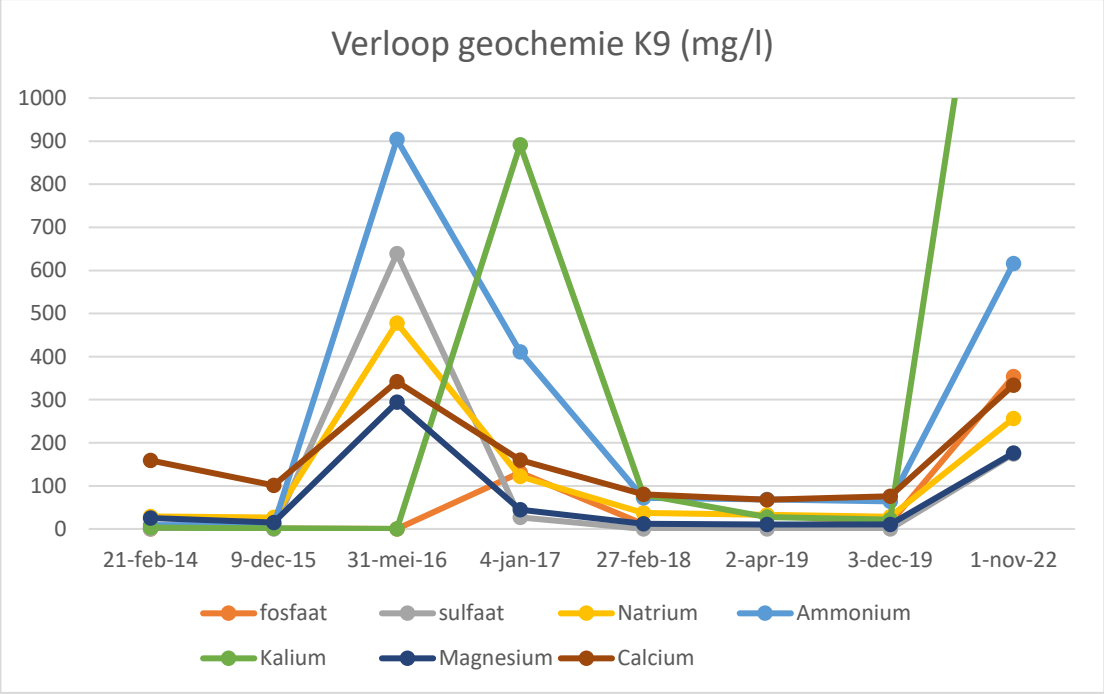


Figuur 4-1 Verloop organische stof in peilbuisselectie

In peilbuis B3, in het brongebied van de verontreiniging, lijkt de uitgangsconcentratie al vrij hoog, maar dit wordt veroorzaakt doordat de verontreinigingen, die zelf immers ook organisch zijn, de meting beïnvloeden. De uitgangsconcentraties liggen in het grondwater op de locatie op 10 à 20 mg/l en dit is te weinig voor de benodigde reductieve dechlorering van de aanwezige verontreinigingsvracht. De concentraties organische stof schieten als gevolg van de verschillende injectierondes omhoog – zozeer dat in de grafiek een logaritmische schaal is gebruikt – en bereiken in diverse controlebuizen waarden tussen 1.000 en 10.000 mg/l. De concentraties zakken na verloop van tijd ook weer, als gevolg van verspreiding van het substraat, zodat herinjecties nodig waren. De injecties konden in het brongebied van de verontreiniging, met de peilbuizen B3, C3, 36 en 103, niet worden herhaald. De herinjecties

hebben zich daarom geconcentreerd op het middenterrein, waar de peilbuizen G11, MF2BIS19 en J9 staan, en op de terreingrens, met onder andere de peilbuizen K9 en L9. In de buurt van peilbuis MF2BIS is niet geïnjecteerd, wat verklaart dat ter plaatse de concentraties organische stof constant laag blijven. Bij J9 is pas in het kader van het onderhavige onderzoek voor het eerst geïnjecteerd.

De elektronendonor bevat tevens diverse anionen en kationen, die deels ook van belang zijn als nutriënten voor de groei van de micro-organismen, waarmee de verspreiding van het geïnjecteerde substraat over het terrein eveneens kan worden gevolgd. Uit de monitoringsresultaten blijkt dat de verspreiding zich grotendeels houdt aan de voorspelling: het substraat verspreidt zich met de verontreiniging mee in westnoordwestelijke richting. Een illustratie van het concentratieverloop van diverse anionen en kationen geeft figuur 4-2. Te zien zijn sterke concentratiestijgingen na elke injectieronde en tussentijds een daling naar het oorspronkelijke niveau. Net als bij de organische stof is dit niet alleen een gevolg van verbruik van de stoffen, maar vooral ook van verspreiding in de bodem. Het substraat stroomt met het grondwater met de verontreiniging mee en blijft daarom bijdragen aan de afbraak.



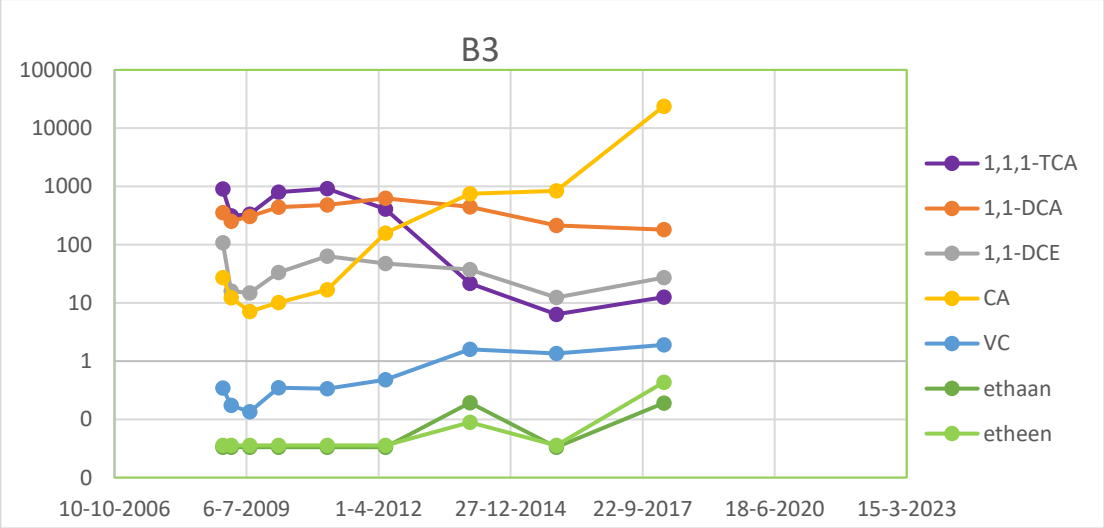
Figuur 4-2 Verloop geochemie in representatieve peilbuis (K9)

Uit de metingen blijkt tevens een tijdelijke toename van ijzer en mangaan in diverse peilbuizen. Deze stoffen zijn niet afkomstig uit het substraat maar ze komen vrij door de toevoeging van organische stof. Dit reduceert niet alleen verontreiniging maar ook zuurstof, nitraat en sulfaat in het grondwater en in de bodem aanwezig ijzer en mangaan. Terwijl de concentraties in het grondwater van de eerste drie daardoor dalen, nemen die van de laatste twee juist toe doordat ze door de reactie in een lagere oxidatietoestand komen en vanuit de vaste bestanddelen van de bodem oplossen. Hierdoor gaat een deel van de elektronendonor verloren aan zogeheten matrixverbruik. De concentraties zuurstof en nitraat zijn laag op de locaties en de kortstondige verhoging van ijzer- en mangaanconcentraties duidt er op dat ook het verlies van elektronendonor aan deze elektronenacceptoren beperkt is. Het matrixverbruik van de bodem ter plaatse is niet als zodanig vastgesteld.

4.1.2 Verontreinigingen in brongebied

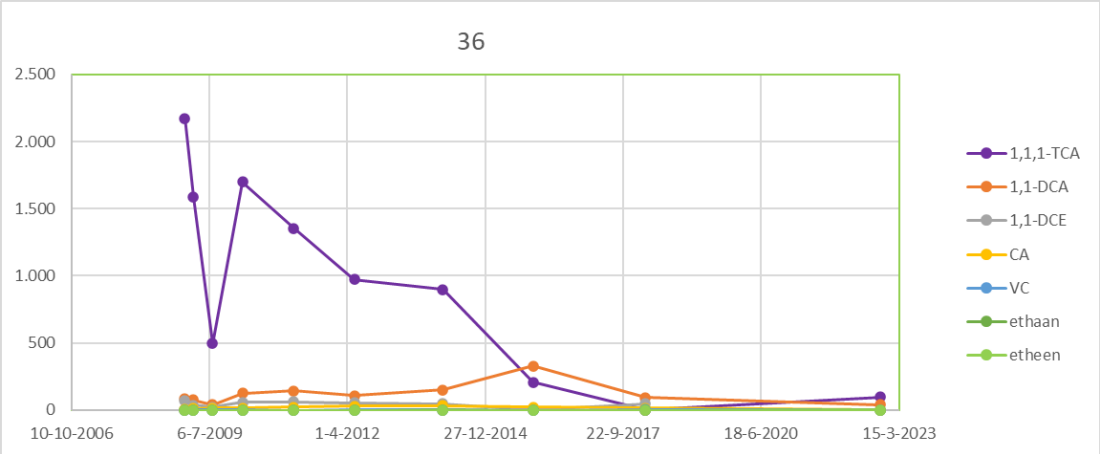
De volgende grafieken geven een indicatie van het effect van de elektronendonorinjecties op de verontreinigingen. De concentraties zijn van µg/l omgerekend naar µmolair, omdat dat een beter beeld van de mate van omzetting van de ene verbinding in de andere: 1 mol trichloorethaan wordt immers uiteindelijk omgezet naar 1 mol ethaan.

Uit figuur 4-3 (met een logaritmische schaal) blijkt dat in het brongebied ter plaatse van peilbuis B3, met hoge uitgangsconcentraties verontreinigingen (TCA circa 120.000 µg/l) duidelijk omzetting van hooggechloreerde naar lager gechloreerde verbindingen plaatsvindt. Naast een stijging van intermediairen chloorethaan en vinylchloride nemen ook de concentraties van niet-gechloreerde eindproducten duidelijk toe. Vinylchloride kan deels afkomstig zijn van trichlooretheen (TCE of TRI), dat hier als nevenverontreiniging is gevonden, met concentraties tot circa 500 µg/l. Maar omdat ook 1,1-dichlooretheen wordt aangetroffen, dat niet een gebruikelijk afbraakproduct is van TCE – dat is cis-1,2-dichlooretheen – is het aannemelijk dat beide in figuur 2-1 gegeven hoofdafbraakroutes van TCA (in het gele blok) op de locatie plaatsvinden.



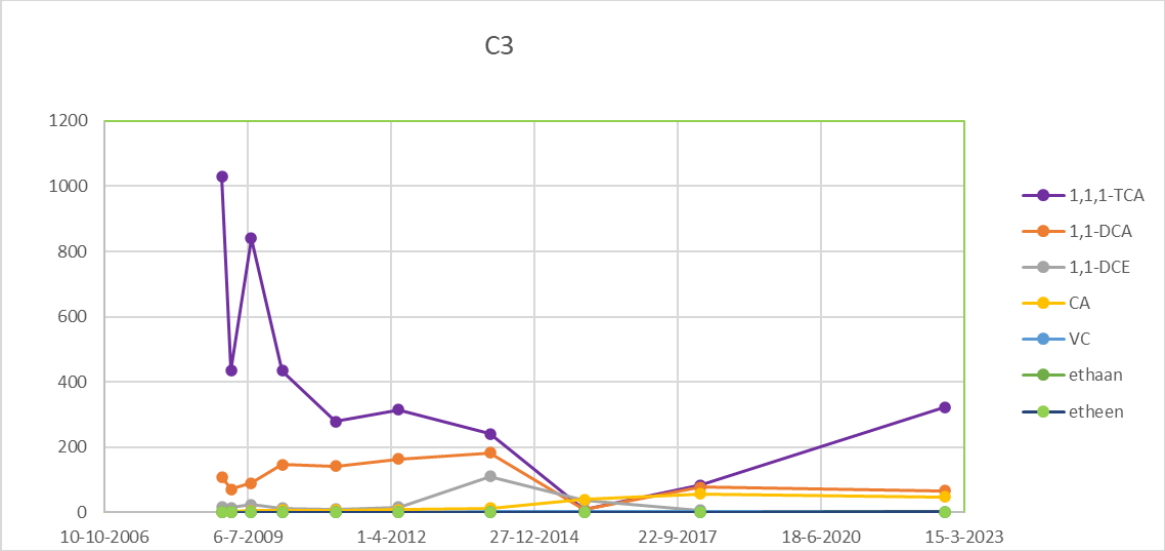
Figuur 4-3 Chloorkoolwaterstoffenverloop peilbuis B3 in µM

In B3 is de laatste jaren niet gemeten. Dat is wel het geval in peilbuis 36, zie figuur 4-4. Daarin is overtuigende afbraak te zien van alle chloorethanen met een aanzienlijke concentratie-afname voor TCA van 290.000 µg/l naar 13.000 µ/g/l.



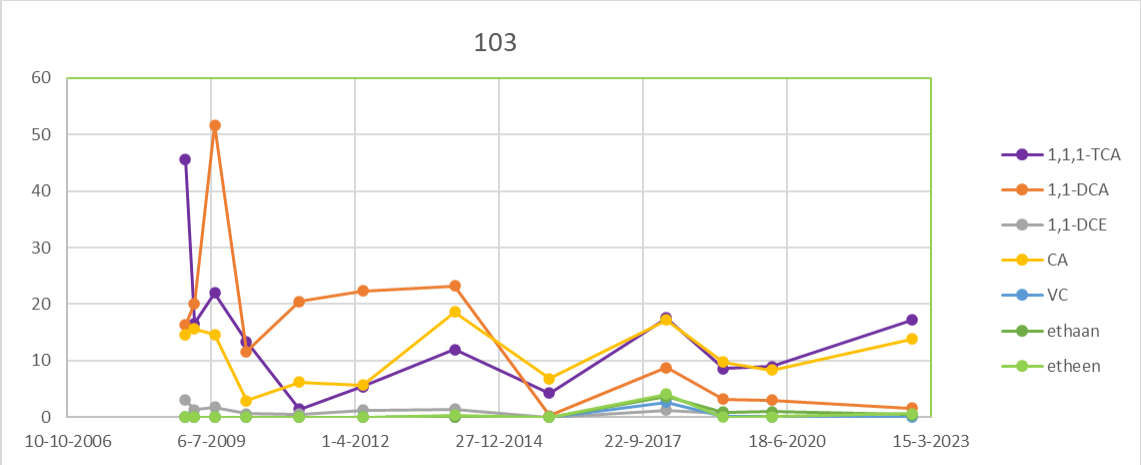
Figuur 4-4 Chloorkoolwaterstoffenverloop peilbuis 36 in µM

Wel is er recent weer een lichte toename van vooral trichloorethaan, waarschijnlijk als gevolg van verspreiding vanuit stroomopwaarts aanwezige verontreiniging. Dit is nog wat duidelijker te zien in peilbuis C3 (figuur 4-5).



Figuur 4-5 Chloorkoolwaterstoffenverloop peilbuis C3 in µM

In peibuis 103 (figuur 4-6) is mooi te zien dat een aanvankelijk afname van trichloorethaanconcentraties gepaard gaat met eerst een toename van dichloorethaan waarna chloorethaan opkomt. Het later opnieuw iets opkomen van trichloorethaan is weer te verklaren door verspreiding van stroomopwaartse verontreiniging. Omdat ook chloorethaan periodiek in concentratie afneemt, is materiaal uit peilbuis 103 gebruikt voor het kweken van chloorethaanafbrekers.



Figuur 4-6 Chloorkoolwaterstoffenverloop in peilbuis 103 in µM

Hoewel de concentraties al aanzienlijk zijn verlaagd, resteren in het kerngebied bij de laatste ronde in november 2022 nog steeds hoge concentraties ter plaatse van peilbuis C3:

- 43.000 µg/l 1,1,1-TCA, 143 x de interventiewaarde van 300 µg/l;
- 6.500 µg/l 1,1-DCA, 7 x de interventiewaarde van 900 µg/l;
- 3.000 µg/l CA, 5 x de ad hoc risicogrenswaarde van 579 µg/l.

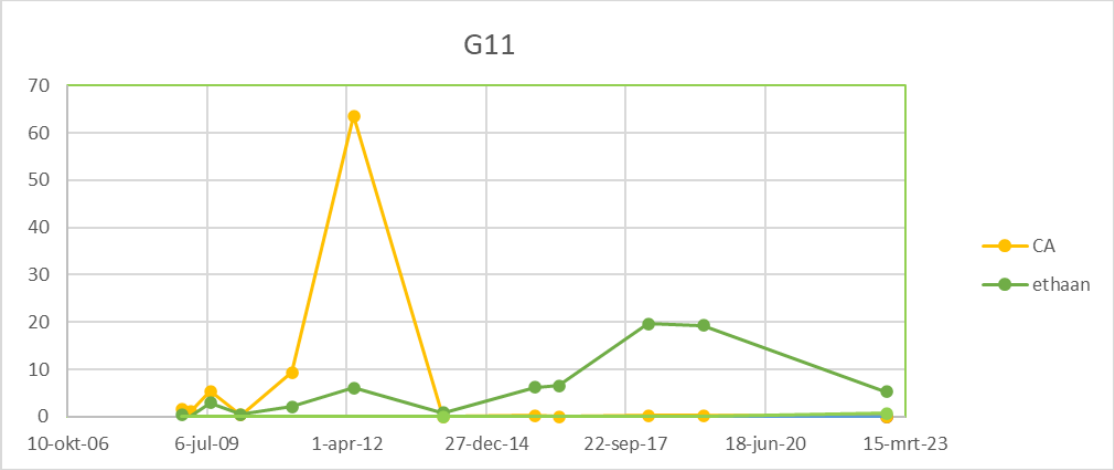
En ter plaatse van B3 vier jaar daarvoor:

- 1.500 mg/l Ca, 2600 x de ad hoc risicogrenswaarde van 579 µg/l;
- 2.600 µg/l 1,1-DCE, 260 x de interventiewaarde van 10 µg/l.

Veel belangrijker voor de sanering dan de restverontreiniging in het brongebied is echter dat de verspreiding van de verontreiniging wordt tegengegaan. Hiervoor is de monitoring van de verontreinigingspluim van belang.

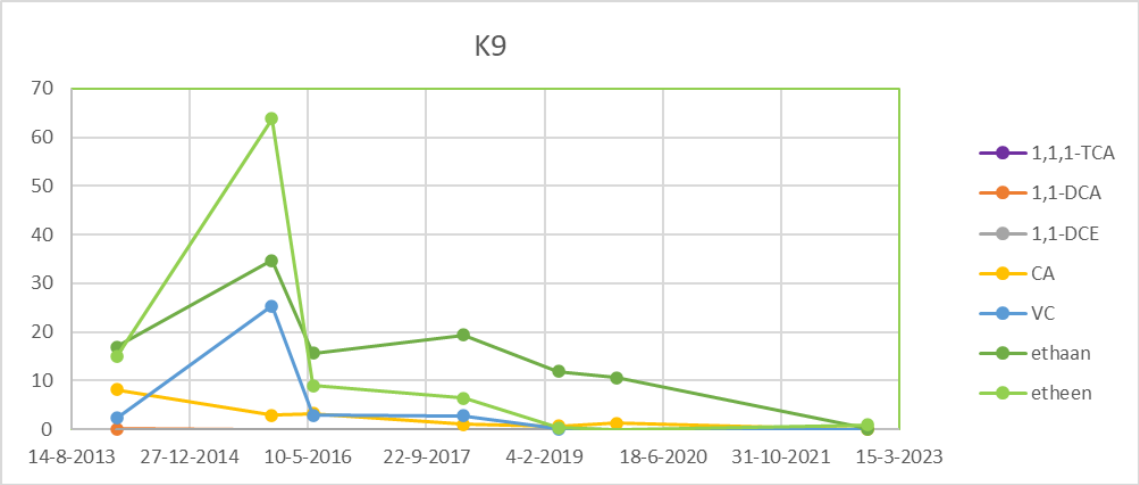
4.1.3 Verontreinigingspluim

Ter plaatse van peilbuis G is altijd alleen het omzettingsproduct CA aanwezig. In het verleden tot concentraties boven de risicogrenswaarde maar inmiddels zijn deze in filter G11 afgenomen tot 3 µg/l. Zie het concentratieverloop in figuur 4-7 waaruit ook blijkt dat het niet-gechloreerde eindproduct ethaan de plaats inneemt van de gechloreerde verbinding.



Figuur 4-7 Chloorkoolwaterstoffenverloop in peilbuis G11 in µM

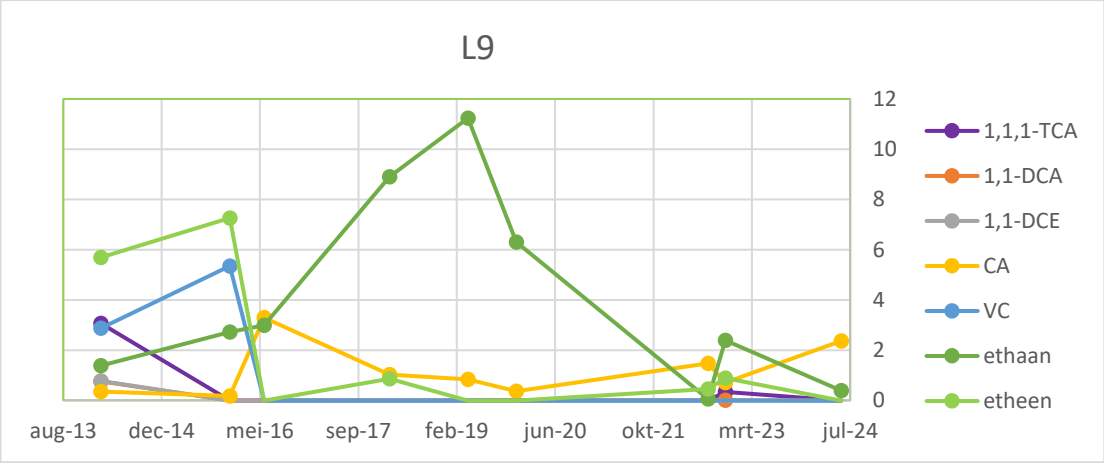
Peilbuis K9, die aan de gebiedsgrens is gesitueerd, geeft een vergelijkbaar beeld; zie figuur 8. Daar is naast CA herhaaldelijk ook VC gevonden, beiden in concentraties van honderden µg/l. Omdat hier in het verleden tevens CIS-dichlooretheen is aangetroffen, is de betreffende VC waarschijnlijk van een nevenverontreiniging met dichloorethenen afkomstig en niet, via de alternatieve afbraakroute (zie figuur 2-1), van de chloorethanen. In ieder geval blijken de gechloreerde koolwaterstoffen ter plaatse inmiddels volledig omgezet in ethaan en etheen.



Figuur 4-8 Chloorkoolwaterstoffenverloop in peilbuis K9 in µM

Opgemerkt wordt dat in de nabijgelegen peilbuis N nog wel steeds hoge concentraties aan cis-DCE en VC aanwezig zijn. Wel beginnen deze na de laatste injectie duidelijk te dalen: van respectievelijk circa 4.000 en 3.000 µg/l in april 2019 naar 450 en 2300 µg/l in november 2022.

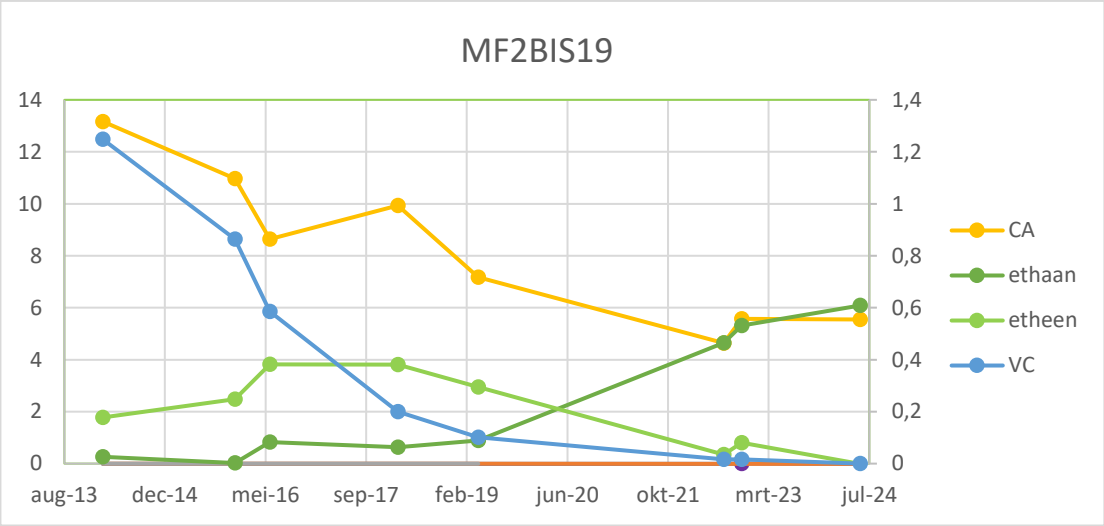
In peilbuis L9 is aanvankelijk geen cis-DCE aangetroffen maar wel 1,1-DCE (zie figuur 4-9). Daarom werd het aannemelijk geacht dat het hier eerder aanwezige VC afkomstig is van 1,1,1-TCA via de alternatieve afbraakroute (zie figuur 2-1). Dit wordt verder afgebroken naar etheen. Daarnaast wordt chloorethaan gevormd, dat vervolgens wordt afgebroken naar ethaan. Wel stroomde er bij de voorlaatste bemonstering van deze peilbuis in 2022 weer wat 1,1,1-TCA de peilbuis in maar deze lijkt in de laatste ronde al weer grotendeels afgebroken tot CA.



Figuur 4-9 Chloorkoolwaterstoffenverloop in peilbuis L9 in µM

Op basis van het bovenstaande lijkt het tot nu toe te lukken om, anders dan de chloorethenen, die zich bij peilbuis N verder verspreiden, de chloorethanen grotendeels binnen de terreingrens te houden. Echter, bij peilbuis J bleven de CA-concentraties, ondanks oplopende ethaanconcentraties, boven de risicogrenswaarde en de daling was tot de uitvoering van de in hoofdstuk 3 beschreven bodemsaneringsmaatregelen nog niet ingezet.

Bij peilbuis MF2BIS, waar de CA-concentraties wel onder de risicogrenswaarde zijn gezakt en waar ethaan eveneens opkomt, stagneert de ingezette daling van CA-concentraties; zie figuur 4-10.



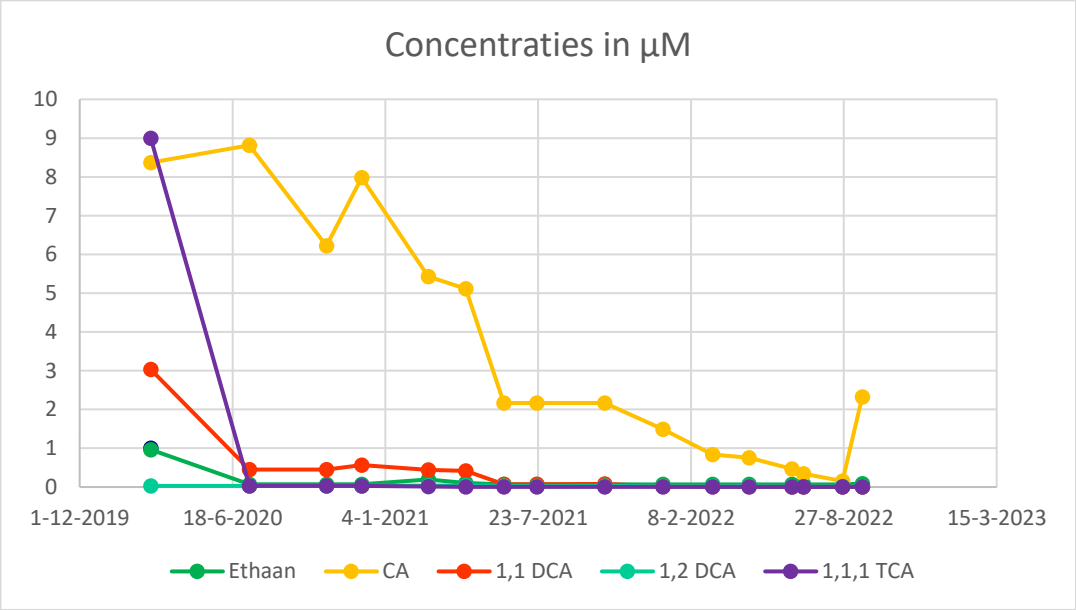
Figuur 4-10 Chloorkoolwaterstoffenverloop in peilbuis MF2BIS19 in µM

Voorts blijkt CA zich al tot buiten het terrein te hebben verspreid. De hoogste concentraties zijn aangetroffen bij peilbuis T9 en zijn ongeveer half zo hoog als de risicogrenswaarde. Verdere verspreiding van CA in de nabije toekomst is op basis van deze bevindingen wel aannemelijk. Om die reden is grondwater uit het brongebied afgetapt voor het kweken van CA-afbrekers in een reactor om deze vervolgens te infiltreren in het pluimgebied, teneinde de afbraak daar te stimuleren.

4.2 Kweek van chloorethaanafbrekers

Het verloop van de chloorethaanconcentraties in de bioreactor is weergegeven in figuur 4-11. De eerste waarden in de grafiek zijn die welke gemeten zijn in de peilbuis waaruit het materiaal is verzameld, nummer 103, op 3 maart 2020.

Te zien is dat achtereenvolgens alle chloorethanen in concentratie afnemen. Het langst blijft (mono)chloorethaan aanwezig. Pas na 2 ½ jaar is dit laatste intermediair ook vrijwel verdwenen, met een restconcentratie van 10 µg/l.



Figuur 4-11 Concentratieverloop (chloor)ethanen in bioreactor

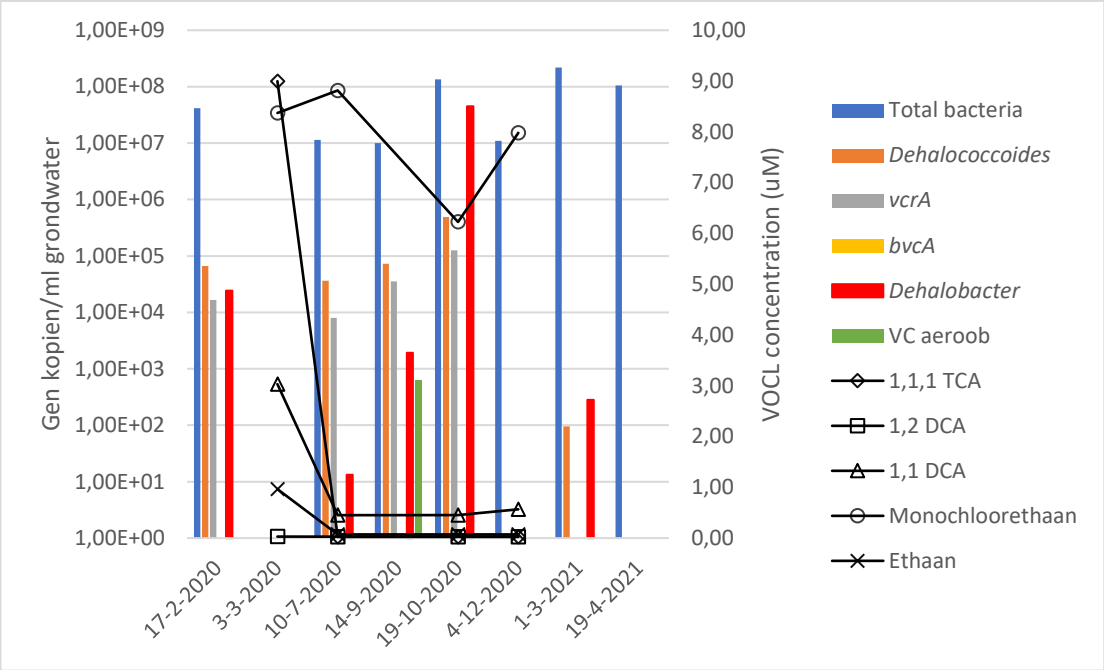
Ethaan wordt slechts in lage concentraties aangetroffen; vaak niet boven de detectiegrens. Het meest aannemelijk is dat deze stof, dat toch het eindproduct is van de reductieve dechlorering, door de trage afbraak slechts in beperkte mate wordt geproduceerd, vervluchtigd naar de dampfase en vervliegt tijdens de monsternames. Een alternatief zou kunnen zijn dat CA aeroob afbreekt, ware het niet dat in de reactor methanogene condities heersten, zoals blijkt uit de tabel 4-1. Een ander alternatief is een vorm van fermentatie. Maar zonder nitraat, met weinig sulfaat, hoge concentraties organische stof (NPOC) en significante methaanproductie waren de condities in de reactor optimaal voor reductieve dechlorering. Wel daalde de methaanproductie, waarschijnlijk juist door de afbraak chloorkoolwaterstoffen, maar de concentraties bleven boven de richtwaarde voor reductieve dechlorering van 1 mg/l. Voorts waren steeds voldoende nutriënten aanwezig. Tussentijdse concentratiestijgingen kunnen worden toegeschreven aan de periodieke toedieningen van protamylasse.

Tabel 4-1 Verloop geochemie bioreactor, concentraties in mg/l

monster	Chloride	Nitriet	Nitraat	Sulfaat	Fosfaat	Natrium	Ammonium	Kalium	Magnesium	Calcium	Methaan	NPOC
19-4-2021	86	0,05	0,3	1,1	59	56	117	343	18	23	12	104
21-7-2021											16	87
7-10-2021	96	0,14	0,4	< 0,5	59	61	107	347	18	24	14	89
2-1-2022	116	0,05	<0,4	1,3	101	64	155	91		24	25	409
7-3-2022	136	0,07	<0,4	0,91	153	87	207	744	38	28	19	420
25-4-2022	148	0,10	<0,4	2,78	200	93	221	867	43	27	8,8	534
20-6-2022	159	0,04	<0,4	0,26	210	116	360	944	48	30	4,5	955
5-7-2022	175	0,01	<0,4	2,15	227	117	392	978	47	30	3,7	437
20-9-2022	238	0,15	<0,4	32,4	109	116	226	885	44	58	39	347

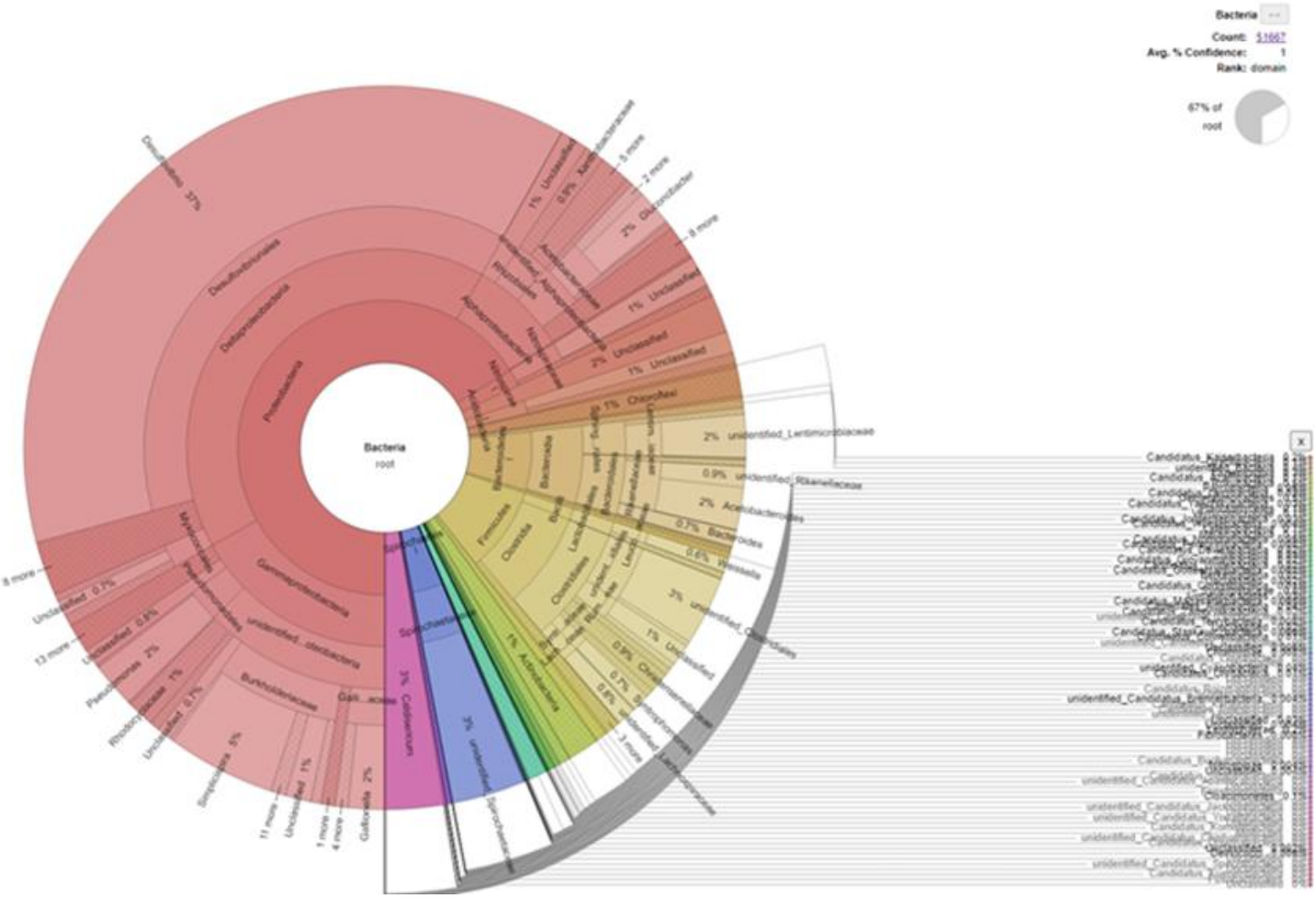
De afwijkende waarden in de laatste ronde zijn een gevolg van verversing met nieuw grondwater – deze keer uit J9 – tegelijk met de bio-augmentatie in het veld.

De vraag was welke micro-organismen de afbraak uitvoeren. De bacteriën die hiervoor in beeld waren, vertoonden niet de groei die men dan zou verwachten, zie figuur 4-12. De aanwezige *Dehalococcoides* en *Dehalobacter* waren waarschijnlijk verantwoordelijk voor de afbraak van de chloorethenen die ook in peilbuis 103 en de reactor aanwezig waren. De aanwezigheid van genen die coderen voor VC-afbrekende enzymen, wijst in dezelfde richting. Van sommige *Dehalobacter*-stammen is bekend dat ze ook betrokken zijn bij de afbraak van 1,1,1-TCA en 1,1-DCA (Grostern & Edwards 2006).



Figuur 4-12 Ontwikkeling genkopieën relevant DNA in bioreactor

Om te achterhalen welke organismen dan wel verantwoordelijk zijn voor de afbraak is een sequencing van het DNA uitgevoerd. Met zogeheten krona-plots wordt de microbiële samenstelling van de populatie in beeld gebracht, zie figuur 4-13. Hieruit blijkt dat *Dehalacoccoides* en *Dehalobacter* in relatief lage aantallen aanwezig waren. Wel bleek de populatie voor een groot deel uit het genus *Desulfovibrio* te bestaan. Van dit organisme is bekend dat het, net als *Dehalobacter*, in staat is 1,1,1-TCA en 1,1-DCA te dechloreren (Grostern & Edwards 2006).

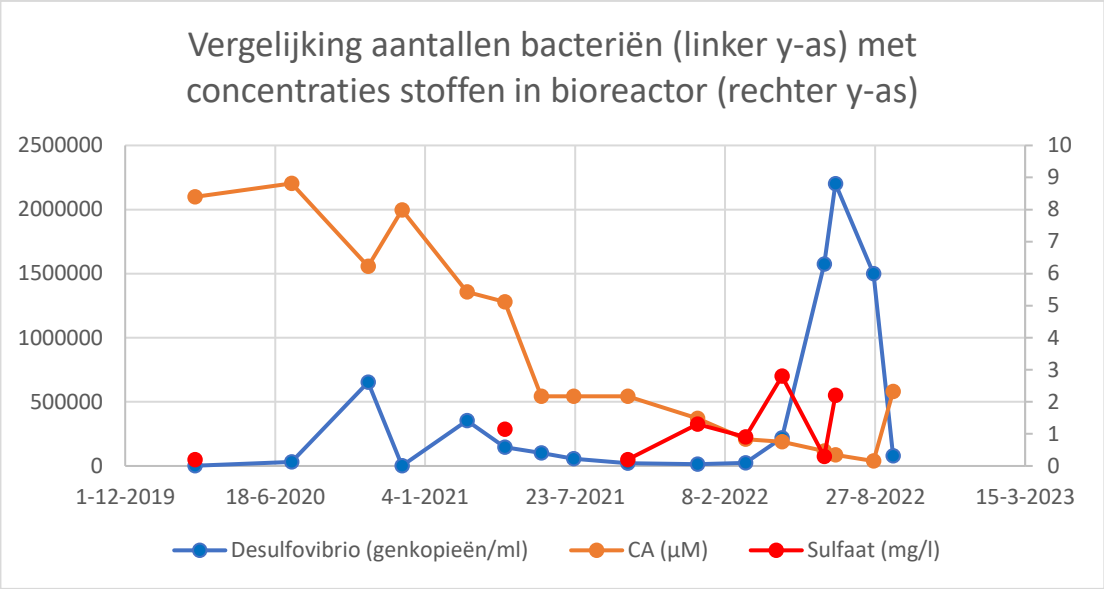


Figuur 4-13 Krona-plot samenstelling microbiële populaties in bioreactor

Desulfovibrio gebruikt normaal gesproken sulfaat als elektronenacceptor. Vaak wordt gevonden dat sulfaat dechlorering remt, maar het omgekeerde komt ook voor. We hebben overwogen om sulfaat aan de reactor toe te dienen toen de toch al gestage afbraak tussen juni en oktober 2021 helemaal stilviel. Het risico is echter niet genomen en in plaats daarvan is protamylasse toegediend dat eveneens sulfaat bevat. Dit had tot gevolg dat de afbraak weer op gang kwam. Kennelijk was de toevoeging van de extra koolstofbron in dit geval belangrijker voor het proces dan de mogelijke remming door sulfaat.

In de figuren 4-14 en 4-15 is het verloop van de concentraties CA en respectievelijk sulfaat en organische stof (NPOC) met de populatie-ontwikkeling van Desulfovibrio weergegeven.

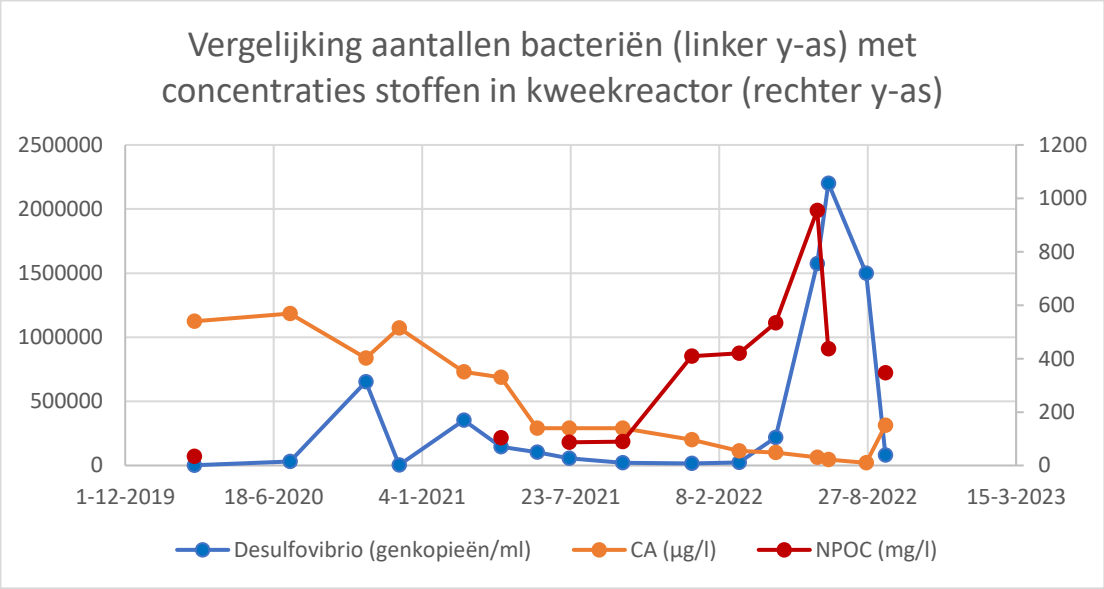
In de beide figuren is te zien dat CA gestaag in concentratie afneemt, na fluctuaties in het begin die kunnen worden verklaard door de vorming uit hoger gechloreerde chloorethanen. Opmerkelijk is dat in die periode een tijdelijk lagere concentratie CA samenvalt met een tijdelijke toename van aantallen *Desulfovibrio*. In de figuren is te zien dat *Desulfovibrio* pas laat substantieel in aantallen toeneemt. Die toename valt samen met de aanwezigheid van sulfaat en het vrijwel volledig afbreken van CA.



Figuur 4-14 Verloop aantallen Desulfovibrio-genen in relatie tot concentraties chloorethaan en sulfaat

De sterke afname van *Desulfovibrio* op het laatst in figuren 4-14 en 4-15 wordt veroorzaakt door de toepassing van het kweekmateriaal uit de reactor voor bio-augmentatie in het veld, gevolgd door het aanvullen van de reactor met vers grondwater. Daarmee is de opgekweekte *Desulfovibrio* grotendeels uit de reactor verwijderd, en is nieuwe CA toegevoegd met het verse grondwater.

De late toename van *Desulfovibrio* in beide figuren kan ermee te maken hebben dat aanvankelijk nog verschillende chloorethenen en hoger gechloreerde ethanen aanwezig waren. Mogelijk werden deze ook afgebroken door *Dehalococcoïdes* en – met name – *Dehalobacter*. *Desulfovibrio* krijgt misschien pas de kans zich te ontwikkelen als deze stoffen vrijwel verdwenen zijn, maar neemt pas een jaar daarna structureel in aantallen toe. Uit figuur 4-14 blijkt dat dit volgt op het verhogen van de sulfaatconcentratie.



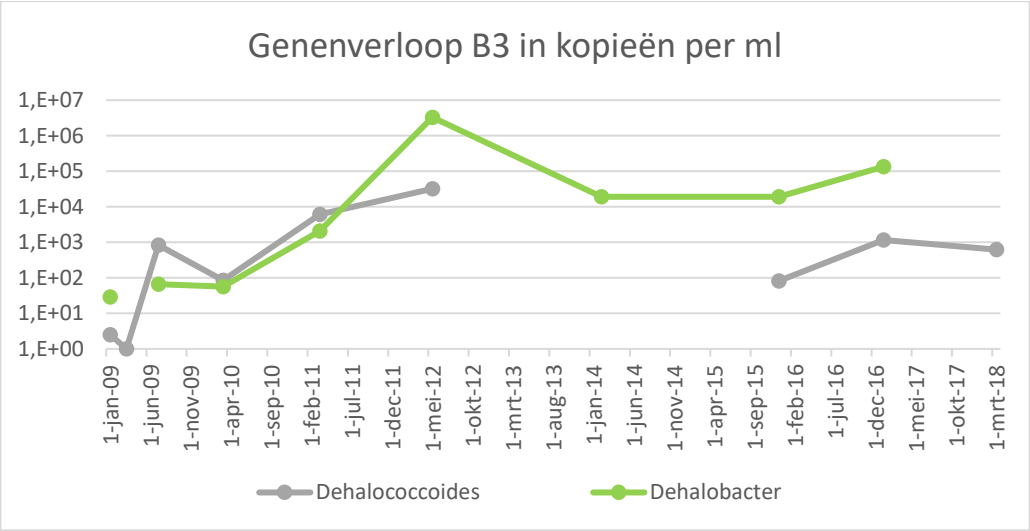
Figuur 4-15 Verloop aantallen Desulfovibrio-genen in relatie tot concentraties chloorethaan en organische stof

Uit figuur 4-15 blijkt dat dit eveneens volgt op het verhogen van de concentratie organische stof maar de hoeveelheid organische stof bevond zich altijd ver boven 20 mg/l, de concentratie die normaalgesproken wordt aangehouden als grenswaarde voor reductieve dechlorering. En na verhoging van de concentratie organische stof van 89 naar 409 mg/l duurt het nog een half jaar voordat de aantallen *Desulfovibrio* substantieel toenemen.

Uit het bovenstaande blijkt dat in de gekweekte cultuur *Desulfovibrio* waarschijnlijk het belangrijkste organisme is dat CA afbreekt. Maar terwijl bij de afbraak van chloorethenen sulfaat remmend werkt, lijkt die stof bij de omzetting van CA juist nodig te zijn. Dit is opmerkelijk omdat gechloreerde koolwaterstoffen als elektronenacceptor fungeren. Men zou daarom verwachten dat sulfaat als concurrerende elektronenacceptor juist een inhiberend effect zou hebben. Maar blijkbaak is het afbraakmechanisme complexer en zijn zowel sulfaat als CA nodig. Misschien is CA zo giftig dat het de eigen afbraak in de weg zit als het te snel accumuleert. Niet uitgesloten is ook dat CA cometabool wordt omgezet, dus zonder dat de bacteriën er energie aan ontlenen.

4.3 Identificatie van chloorethaanafbrekers op de locatie

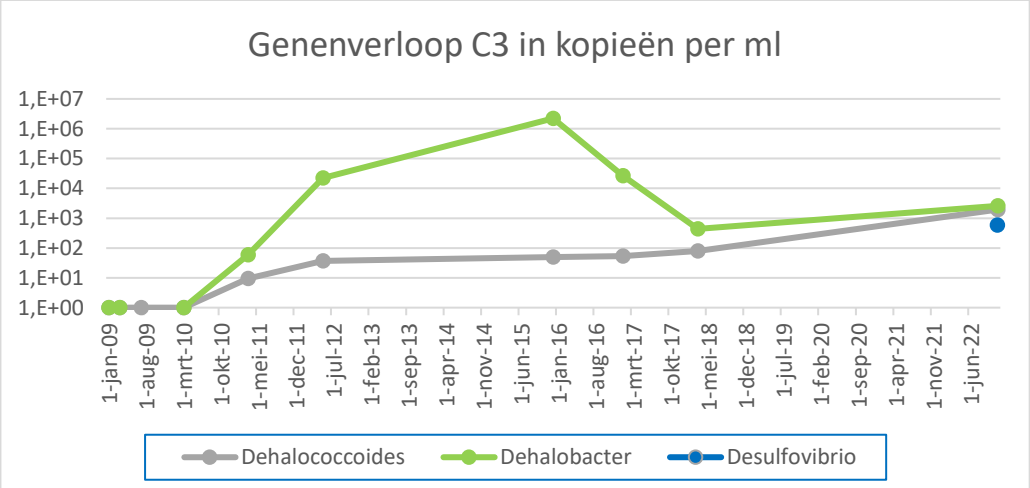
In peilbuis B3 in het brongebied van de verontreiniging is al in 2009 elektronendonor toegediend. Aanvankelijk is daar groei waargenomen van *Dehalococcoïdes* en *Dehalobacter;* zie figuur 4-16. Vooral de aantallen van die laatste blijven lang hoog. Om deze reden was dit organisme aanvankelijk de belangrijkste kandidaat voor chloorethanenafbraak. Maar ter plaatse van B3 waren ook chloorethenen aanwezig; naast VC ook cis-DCE en TRI. Mogelijk worden vooral deze gebruikt door de aanwezige populaties. CA nam hier ook steeds meer toe. De laatste jaren is deze peilbuis niet meegenomen bij de monitoring. *Desulfovibrio* is hier niet gemeten omdat de qPCR analyse nog niet beschikbaar was



Figuur 4-16 Verloop van relevante micro-organismen in peilbuis B3 (van januari 2009 t/m maart 2018)

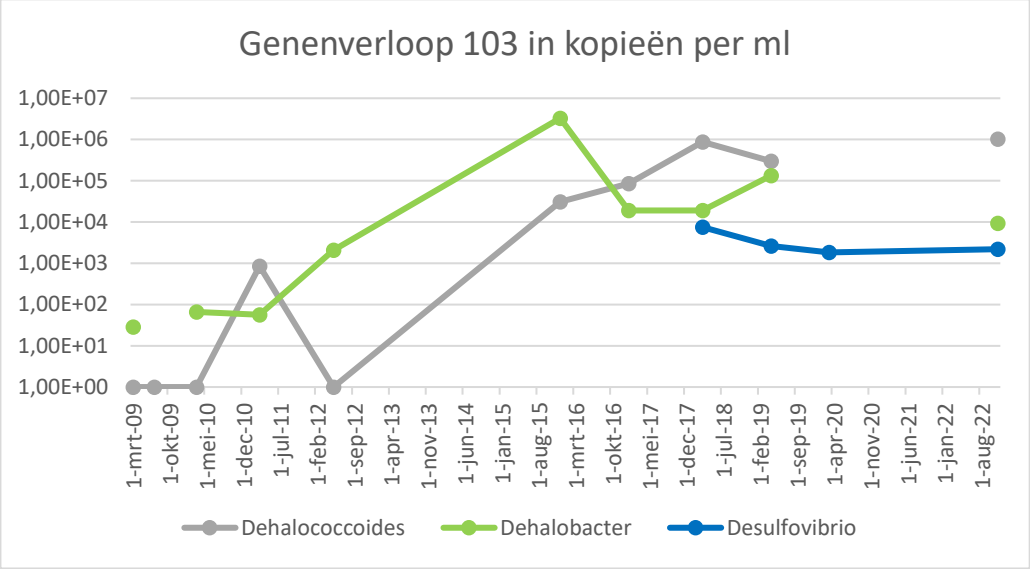
Peilbuis C3 ligt net buiten het injectiegebied. Waarschijnlijk daardoor duurt het hier wat langer dan bij B3 voordat de aantallen *Dehalococcoïdes* en *Dehalobacter* omhooggaan; zie figuur 4-17. *Dehalococcoïdes* groeit minder dan bij B3. Dit kan er mee te maken dat hier veel minder chloorethenen aanwezig zijn. VC was wel altijd aanwezig, cis-DCE is hier nooit aangetroffen en TRI is na 2015 een aantal jaren niet meer teruggevonden. Mogelijk is dat de reden van de terugval van *Dehalobacter*. Bij de laatste ronde is wel weer wat TRI gemeten, maar aan de betrouwbaarheid van deze afwijkende meting wordt getwijfeld. Het zou overigens wel kunnen verklaren dat de genenaantallen van *Dehalococcoïdes* en *Dehalobacter* weer iets toenemen.

Anderzijds zijn hier toch vooral chloorethanen gevonden die duidelijk worden afgebroken, zie figuur 5. *Desulfovibrio*, die in de laatste meetronde kon worden meegenomen, is ook aangetroffen.



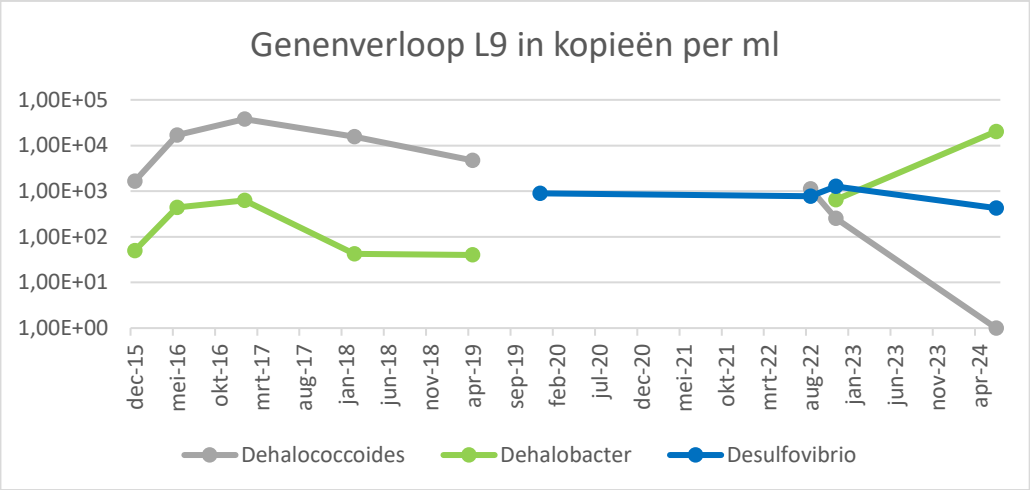
Figuur 4-17 Verloop van relevante micro-organismen in peilbuis C3

Ter plaatse van peilbuis 103 lijken van alle dechloreerders vitale populaties aanwezig, zie figuur 4-18. Doordat chloorethenen hier slechts zeer beperkt aanwezig zijn, is het aannemelijk dat het hele consortium dechloreerders een rol speelt bij de gevonden afbraak van de chloorethanen.



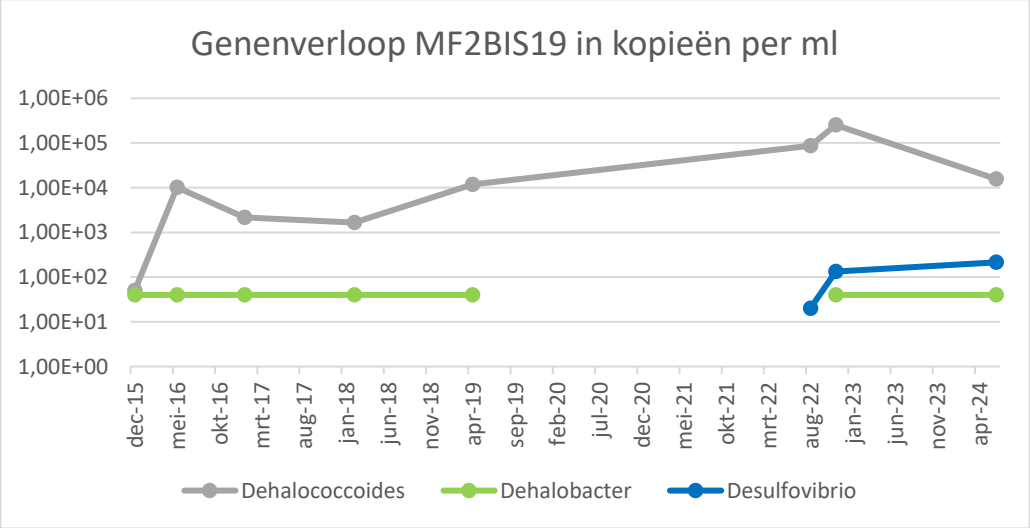
Figuur 4-18 Verloop van relevante micro-organismen in peilbuis 103

In peilbuis L9 in de verontreinigingspluim waar volledige afbraak van de chloorethanen tot ethaan optreedt (zie figuur 4-9) nemen *Dehalococcoïdes* en *Dehalobacter* na de elektronendonorinjecties relatief licht toe, zoals blijkt uit figuur 4-19. De aantallen *Desulfovibrio*-genen liggen ongeveer op hetzelfde niveau als in de verontreinigingsbron. Dit bevestigt dat dit organisme een significante rol kan spelen bij de afbraak van de chloorethanen. Bij de laatste ronde neemt evenwel *Dehalobacter* in aantallen toe maar dat kan een gevolg zijn van de gevonden toename van chloorethenen bij deze peilbuis (zie § 4.1.3).



Figuur 4-19 Verloop van relevante micro-organismen in peilbuis L9

MF2BIS19 is niet beïnvloed door geïnjecteerde elektronendonor (zie figuur 4-1). Waarschijnlijk als gevolg hiervan neemt *Dehalobacter* hier niet in aantallen toe: zie figuur 4-20. Wel zijn *Dehalococcoïdes* in relatief hoge aantallen aanwezig. Dit kan veroorzaakt worden door instroom van deze organismen of van VC, dat dit organisme goed kan afbreken en dat hier ook duidelijk wordt omgezet (zie figuur 4-10 in § 4.1.3). De afgelopen jaren is hier geen VC meer gevonden, wat de recente afname van aantallen *Dehalococcoïdes* zou kunnen verklaren. De aantallen *Desulfovibrio* zijn stabiel. Dit komt overeen met de hier gevonden zeer geleidelijke omzetting van CA naar ethaan zonder dat de concentraties sterk dalen.

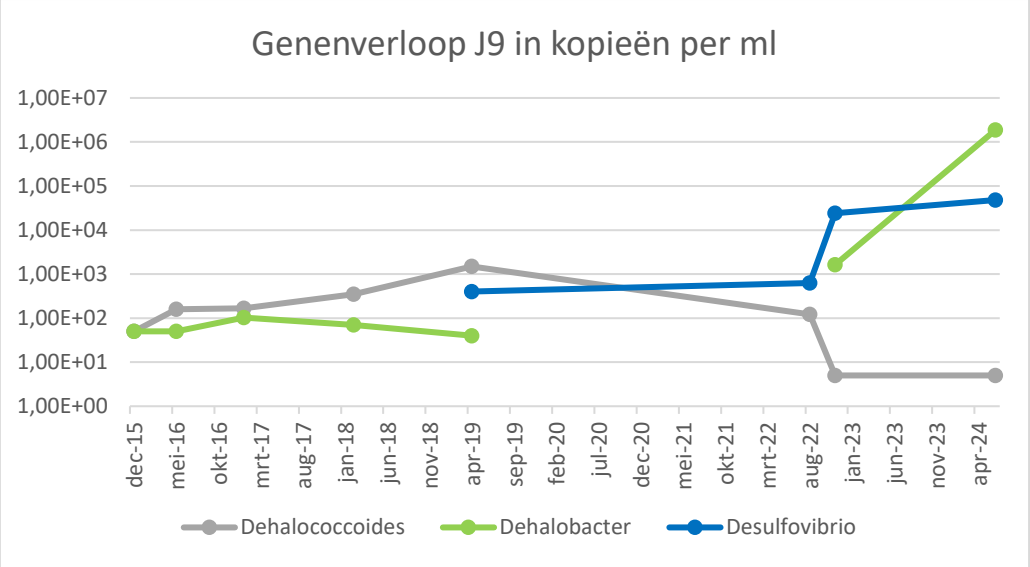


Figuur 4-20 Verloop van relevante micro-organismen in peilbuis MF2BIS19

4.4 Bio-augmentatie

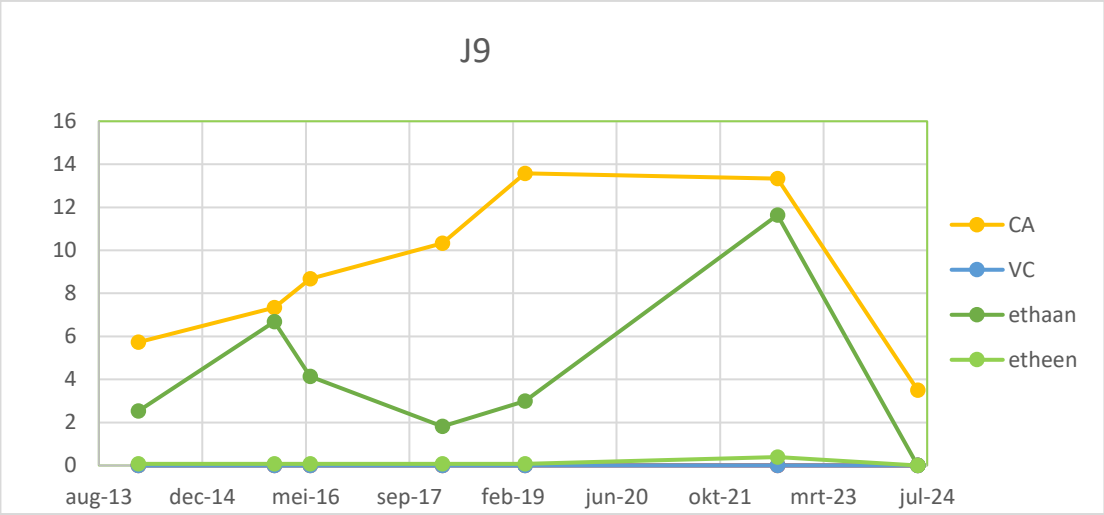
Op het middenterrein is peilbuis J9 pas bij de laatste ronde beïnvloed door de elektronendonorinjecties (zie figuur 4-1). In overeenstemming met de verwachting dat groei van chloorethanenafbrekende bacteriën hier nog niet wordt gestimuleerd, laten de aantallen genen een vlak verloop zien in figuur 4-21. Mogelijk zijn de gevonden organismen afkomstig van het bovenstroomse gebied. Door de injectie met materiaal uit de bioreactor stijgen de aantallen *Desulfovibrio* en in mindere mate *Dehalobacter* en dalen de aantallen *Dehaloccocoïdes* in de voorlaatste monitoringsronde. In de laatste ronde blijven de aantallen

van *Desulfovibrio* stabiel, terwijl die van *Dehalobacter* groeien. Aangezien er bij peilbuis J nooit chloorethenen zijn gevonden, zou dit erop kunnen duiden dat *Dehalobacter* eveneens een rol speelt bij de afbraak van CA, dat hier als enige chloorkoolwaterstof voorkomt. Maar ook kan de toename van Dehalobacter al stroomopwaarts plaats hebben gevonden met behulp van de daar voorkomende hoger gechloreerde ethanen. Mogelijk zijn in de bodem de condities voor *Dehalobacter* beter dan voor *Desulfovibrio*. Waarschijnlijk is dan de sulfaatconcentratie, met 1,5 mg/l in de laatste monitoringronde, te laag voor *Desulfovibrio*.



Figuur 4-21 Verloop van relevante micro-organismen in peilbuis J9

In overeenstemming met de bevinding dat de groei van chloorethaanafbrekende organismen op het middenterrein bij J9 nog niet was gestimuleerd, nam de concentratie CA hier in 2019 toe tot bijna 900 µg/l, ruim boven de risicogrenswaarde van 579 µg/l. Dit is het gevolg van verspreiding van bovenstroomse verontreiniging waar CA is gevormd uit hoger gechloreerde ethanen. Andere chloorkoolwaterstoffen zijn in J9 niet aangetroffen. Wel was er ook omzetting naar ethaan, met alleen een tussentijdse terugval. Analyse op chloorkoolwaterstoffen was kort na de bio-augmentatie niet mogelijk, vanwege een te moeilijke monstermatrix als gevolg van de substraatinjectie. Bij de laatste monitoringsronde blijkt CA evenwel duidelijk af te nemen. Dit wijst op stimulatie van de afbraak, al wordt dit niet bevestigd door meting van toenemende ethaanconcentraties. Gezamenlijke afname van de beide stoffen zou kunnen duiden op verdunning met schoner grondwater, maar ook kan uit CA gevormd ethaan verder stromen of eveneens weer worden omgezet.



Figuur 4-10 Chloorkoolwaterstoffenverloop in peilbuis J9 in µM

Buiten het terrein is bio-augmentatie van kweekmateriaal uitgevoerd ter plaatse van T3 en T9 en KL03. Ter plaatse is *Desulfovibrio* teruggevonden in aantallen van respectievelijk circa 480.000, 444.000 (was 2 ½ jaar eerder 882) en 15.000 kort na de bio-augmentatie. Dat laatste aantal is lager dan wat er bij de nabijgelegen peilbuis U3, waar geen bio-augmentatie is uitgevoerd, is gevonden: 37.000 genkopieën. Bij de laatste monitoringsronde nemen in de eerstgenoemde drie peilbuizen de aantallen *Desulfovibrio* iets af en in de laatstgenoemde licht toe. Ook hier kan de oorzaak lage concentraties sulfaat zijn.
De aantallen *Dehalobacter* zijn vergelijkbaar en deze nemen juist wel toe. Dat kan te maken hebben met recent geconstateerde instroom van chloorethenen in het gebied.

In de meeste peilbuizen in het injectiegebied dalen de CA-concentraties significant in de beide laatste monitoringsronden. In dit gebied wordt tevens ethaanproductie waargenomen. Dit wijst duidelijk op afbraak.

In nieuw geplaatste peilbuizen in een in 2023 aangelegd helofytenfilter (zie figuur 3.1) om een pluim met CIS en VC af te vangen, zijn eveneens *Dehalobacter* en *Desulfovibrio* aangetroffen. Dit duidt erop dat in dit helofytenfilter ook CA zal worden afgebroken. CA is in het helofytenfilter niet aangetroffen; evenmin als de andere chloorkoolwaterstoffen.

5 Evaluatie en conclusies

Op basis van de bevindingen zijn op de gestelde onderzoeksvragen de volgende concrete antwoorden mogelijk:

1. *Welke organismen in de microbiële populatie zijn verantwoordelijk voor de chloorethaanafbraak, en wat zijn de optimale condities van het grondwater (temperatuur, redox, nutriënten, etc.) voor vermeerdering?*
   Het lijkt erop dat verschillende dechloreerders een rol kunnen spelen bij de afbraak van chloorethanen maar dat de dechlorering van CA vooral door *Desulfovibrio* wordt uitgevoerd. De benodigde condities zijn vergelijkbaar met die voor chloorethenenafbraak, met dit verschil dat de aanwezigheid van sulfaat nodig lijkt te zijn.
2. *Kan een chloorethaanafbrekende microbiële populatie in een waterreactor worden opgekweekt, die geschikt is voor bio-augmentatie?*
   Dat is inderdaad mogelijk, maar tijdens het onderzoek was het wel een langdurig proces. Oorzaken daarvoor zouden kunnen zijn dat CA te giftig is bij ophoping en/of dat de afbraak cometabool is. Echter, de condities bleken achteraf in de reactor lange tijd niet optimaal te zijn geweest. Met aanwezigheid van voldoende sulfaat is de populatiegroei waarschijnlijk flink te versnellen. Voorts zijn in de bioreactor populatie-aantallen voor *Desulfovibrio* gerealiseerd die een paar honderd keer boven die welke doorgaans in het veld zijn aangetroffen liggen.
3. *Kan door bio-augmentatie (in combinatie met elektronendonorinjectie) de afbraaksnelheid van chloorethanen in het grondwater worden versneld?* Ook met alleen elektronendonorinjecties wordt de afbraak reeds versneld. In de uitgevoerde veldproef lijkt het effect van het toedienen van gekweekte organismen nog beperkt. Het verdient aanbeveling te bekijken of met een optimalisatie door toediening van sulfaat dit effect kan worden verhoogd. Dit kan op een andere proeflocatie worden getest. Op de huidige proeflocatie lijkt de aanleg van een helofytenfilter voldoende effect te sorteren.

Deltares is een onafhankelijk kennisinstituut voor toegepast onderzoek op het gebied van water en ondergrond. Wereldwijd werken we aan slimme oplossingen voor mens, milieu en maatschappij.

Deltares

www.deltares.nl