

Laboratoriumonderzoek BTEX-afbraak onder sulfaatreducerende condities



Laboratoriumonderzoek BTEX-afbraak onder sulfaatreducerende condities

Auteur(s)

Sem Braaksma
Nanne Hoekstra
Jan Gerritse

Laboratoriumonderzoek BTEX-afbraak onder sulfaatreducerende condities

Opdrachtgever	T&K Technology and Knowledge
----------------------	------------------------------

Documentgegevens

Versie	0.1
Datum	21-02-2024
Projectnummer	11209163-009
Document ID	11209163-009-BGS-0001
Pagina's	27
Classificatie	
Status	definitief

Auteur(s)

	Sem Braaksma	
	Nanne Hoekstra	

Samenvatting

In dit rapport wordt de voortgang beschreven van een anaeroob reactorexperiment voor het ontwikkelen van een bacteriecultuur die benzeen, toluen, ethylbenzeen en xylenen (BTEX) met sulfaat als elektronenacceptor afbreekt. Hierbij is met BTEX verontreinigd grondwater van een met persulfaat behandelde locatie in twee anaerobe bioreactoren geïnoculeerd.

De eerste reactor (de "BTEX-reactor") is gestart met BTEX verontreinigd grondwater van een locatie in Eibergen. BTEX in de reactor brak hierin snel af, maar dit bleek te komen door persulfaat en calciumperoxide in het bemonsterde grondwater. Kennelijk waren deze stoffen hierin nog aanwezig na dosering van deze chemische-oxidatie-middelen op de locatie. De BTEX-reactor is daarom overgezet van grondwater naar anaeroob sulfaat-houdend kweekmedium, zonder chemische oxidanten. Sequentiële doseringen van BTEX aan de reactor leidde echter niet tot sulfaat-gestimuleerde afbraak gedurende een periode van 10 maanden.

De tweede reactor (de "benzeen-reactor") was een reactor met micro-organismen die gedurende 20 jaar actief anaeroob benzeen heeft afgebroken met gebruik van nitraat als elektronenacceptor. Het overzetten van de benzeen-reactor van nitraat naar sulfaat was succesvol na bij-enten met de populatie micro-organismen uit de BTEX-reactor. De vorming van sulfide toonde aan dat benzeenafbraak in de reactor gekoppeld is aan sulfaat-reductie. Vervolgens is ook aan die reactor BTEX gedoseerd. Drie sequentiële doseringen van BTEX aan de benzeen-reactor leidde tot adaptatie van de microbiële populatie en afbraak van, naast benzeen, eerst toluen, daarna meta- en para-xyleen en uiteindelijk ook ethylbenzeen. Afbraak van ortho-xyleen is binnen de experimentele periode van 73 dagen nog niet vastgesteld.

Daarnaast zijn batches ingezet: één duplo (A+B) van grondwater dat eerst door de BTEX-reactor was gepompt, één duplo (C+D) van medium dat eerst door de BTEX-reactor was gepompt en één duplo (E+F) vanuit de benzeenreactor, nadat deze was overgeschakeld op sulfaatreductie. In batches A+B is sulfidevorming en afname van, voornamelijk, TEX gedetecteerd. In batches C+D is geen sulfidevorming of afname van BTEX gedetecteerd. In batches E+F is geen sulfidevorming gedetecteerd; in batch E zijn vooral p-/m-xyleen in concentratie afgenomen, in batch F zijn de meeste BTEX niet meer detecteerbaar.

Inhoud

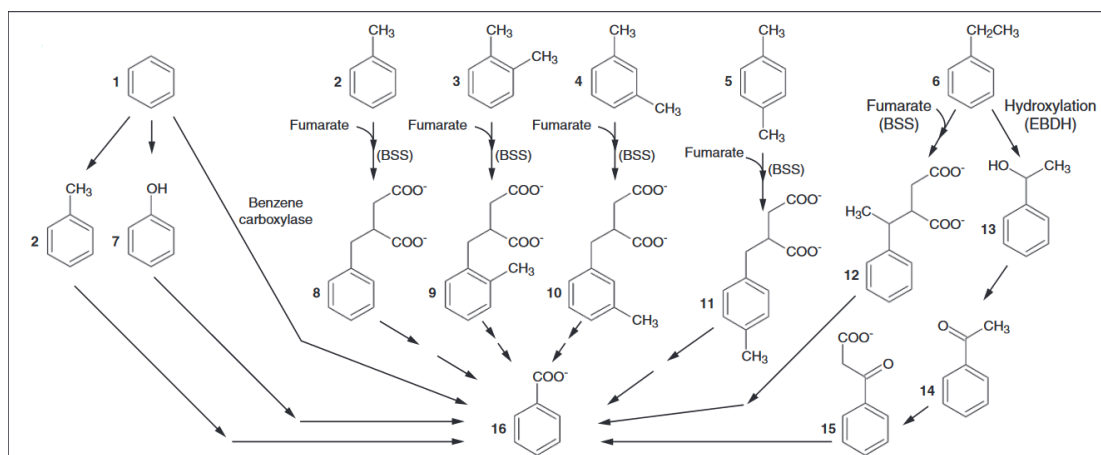
	Samenvatting	4
1	Doel	6
2	Bekende gegevens uit de literatuur	7
3	Materialen en methoden	8
3.1	Reactoren	8
3.2	Entmateriaal en doorstromsnelheden	8
3.3	Stockoplossingen	11
3.4	Batches	11
3.5	Gaschromatografie	12
3.6	Colorimetrische assays	12
4	Resultaten	13
4.1	BTEX-Reactor	13
4.2	Benzeenreactor	14
4.3	Batchincubaties	16
5	Discussie	18
6	Conclusies	20
7	Aanbevelingen	21
8	Referenties	22
A	Foto's van de bioreactoren	23
B	Resultaten van vooronderzoek grondwater	25

1 Doel

Het doel van het project is het kweken van bacteriën die vluchtige aromaten (benzeen, toluen, ethylbenzeen en xylene; kortweg BTEX) in de bodem onder sulfaatreducerende condities goed kunnen afbreken. Met een dergelijke kweek kan op locaties die met persulfaat en calciumperoxide zijn behandeld de biologische afbraak worden gestimuleerd. Hiermee kan in een vervolgproject een gecombineerde chemische en biologische bodemsaneringsmethode worden ontwikkeld. Een andere mogelijke toepassing is op met BTEX verontreinigde locaties enkel de kweek te doseren en de afbraakcondities te optimaliseren.

2 Bekende gegevens uit de literatuur

Er is van meerdere micro-organismen bekend dat zij BTEX kunnen afbreken onder verschillende anaerobe omstandigheden, met name nitraat-reducerende, sulfaat-reducerende, ijzer-reducerende en methanogene condities (Callaghan, 2013). Hiervan is bekend dat toluene, ethylbenzeen en xylenen (TEX) afgebroken worden via fumarate-additie die wordt gekatalyseerd door het enzym benzylsuccinaatsynthase (Figuur 1). Het gen in het DNA dat codeert voor de synthese van benzylsuccinaatsynthase (*bssA*) is gevonden in micro-organismen die niet evolutionair aan elkaar verwant zijn, wat duidt op verspreiding via horizontale genetische uitwisseling (Staats et al., 2011). Voor ethylbenzeen zijn meerdere afbraakmechanismen gevonden, waaronder hydroxylering. Anaerobe benzeenafbraak verloopt via carboxylering, de additie van CO₂ aan de aromatische ring door enzym benzeencarboxylase, gecodeerd in het DNA met het gen *abcA* (Callaghan, 2013; Atashgahi et al., 2018; van der Waals et al., 2017). De afbraakroutes van BTEX komen later samen bij benzoyl-CoA, waarna het enzym 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase (*bamA*) zorgt voor verdere afbraak.



Figuur 1. Overzicht van biologische activeringsmechanismes voor BTEX-degradatie. Overgenomen van Callaghan, 2013

3 Materialen en methoden

3.1 Reactoren

Voor het beoogde kweken van micro-organismen zijn doorstroomreactoren gebruikt. Vergeleken met culturen in kweekflessen, zogeheten batches, treedt hierin geen ophoping van reactanten op, wat remming van populatiegroei met zich mee kan brengen.

De gebruikte anaerobe bioreactoren zijn van het merk Applikon en hebben een volume van 2,5 liter. Ze zijn geplaatst in een lekbak in een verduisterd laboratorium. Het zuurstofgehalte, de pH, redox-potentiaal, temperatuur en roersnelheid worden continu gemeten met sensoren (Applikon) en een datalogstelsel (BioXpert). Het doseersysteem voor grondwater, effluent en 95%/5% N₂/CO₂ gas bestaat uit Masterflex rubberen slangen en één peristaltische pomp. Het doseren van grondwater en gas en het afpompen van effluent gebeurt daarmee altijd met dezelfde snelheid.

Er zijn twee bioreactoren gebruikt. Eén is, speciaal voor het testen van BTEX-afbraak met sulfaat, nieuw opgestart; de andere had al twintig jaar gefunctioneerd en realiseerde benzeenafbraak met nitraat. Aan laatstgenoemde reactor wordt continu benzeen gedoseerd.

Het doseersysteem voor BTEX en Na₂SO₄ bestaat uit een spuitenpomp met twee posities voor spuiten. In de reactoren hangen een pH-elektrode, dO₂-elektrode en Eh/redox-elektrode, welke continu gemonitord worden d.m.v. een Applikon 1010/1030 BioController. Sulfaat-, nitraat-, nitriet- en ijzerconcentraties zijn gecontroleerd met MQuant strips.

Foto's van de bioreactoren zijn toegevoegd in bijlage A.

Voordat de incubatie was gestart zijn alle elektroden gekalibreerd. Hiervoor is de pH-elektrode geijkt op een pH 4.01 en pH 10.01 vloeistof en gecontroleerd met een pH 7.01 vloeistof. De dO₂-elektrode is geijkt op een met perslucht vergast watermonster in een erlenmeyer (100% dO₂) en een met stikstof vergast watermonster in een erlenmeyer (0% dO₂). De redox-elektrode is geijkt met Applikon-specifieke ijkvloeistof voor deze elektrode.

Na het acclimatiseren van de BTEX-reactor met het grondwater, werd regelmatig een lage concentratie zuurstof in de bioreactor gedetecteerd. De reactor bleek niet volledig gasdicht te zijn afgesloten. Dit is opgelost (op 16 februari en 21 maart) met het vervangen van bemonsteringspoorten, rubberen O-ringen en rubberen slangen. De lekdichtheid van de reactor is hierna geverifieerd door de reactor in water onder te dompelen.

3.2 Entmateriaal en doorstroomsnelheden

Entmateriaal was beschikbaar van saneringslocaties in Ede, Eibergen en Hoogeveen. Op basis van de uitgevoerde analyses in het vooronderzoek is besloten om grondwater van de locatie Eibergen, peilbuis 23/24 aan te sluiten op de bioreactor. Specifiek is voor deze locatie gekozen vanwege de aanwezigheid van ijzer en sulfaat (respectievelijk 29 en 1192 mg/L in peilbuis 23, zie Bijlage B) en de relatief lage concentraties nitraat en nitriet (respectievelijk 0,07 mg/L en niet aangetoond in peilbuis 23, zie Bijlage B). Verder is de aanwezigheid van sulfaatreductie- (*drsA*) en benzeenafbraakgenen (*bssA*, *abcA* en *bamA*) op deze locatie aangetoond (Bijlage B). Dit grondwater is aangeleverd in een Nalgene vat van ruim 20 liter.

Hierop past een Nalgene dop met slangconnectors, waarop Masterflex rubberen slangen zijn aangesloten voor het afnemen van vloeistof, het doorbubbelen van gas en een gasuitlaat, zodat het influent ook anaeroob gehouden kan worden. De effluentslang is aangesloten op een tweede Nalgene vat van ruim 20 liter, hierin wordt het effluent opgevangen.

Demiwater	19,8 liter
KH ₂ PO ₄	10 g.
Na ₂ HPO ₄	16 g.
NH ₄ Cl	5 g.
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	4 g.
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 g.
Na ₂ SO ₄	25 g.
NaHCO ₃	12,5 g.
Sporenelementen "SL-4"	200 ml
Sporenelementen "SL-+'	20 ml

Het grondwater is na het starten met 10-20 ml/uur gedoseerd. Hiernaast is via een spuitpomp een mengsel van BTEX en Na₂SO₄ gedoseerd, tot eindconcentraties van respectievelijk 0,05-0,40 en 5-40 µM. Nadat 20 liter grondwater door de reactor was gepompt (na 65 dagen), is de grondwaterpomp uitgeschakeld en is de reactor verder geïncubeerd als batch. Gedurende deze periode zijn BTEX en Na₂SO₄ handmatig gedoseerd, in doses van respectievelijk 50 µM en 5 mM. Na 121 dagen is overgegaan op een oplossing van pure BTEX (in verhouding 1:1:1:1 B:T:E:X).

Gedurende deze batchfase is ontdekt dat het aangeleverde grondwater nog verhoogde concentraties persulfaat, en vermoedelijk ook calciumperoxide, bevatte. Hierdoor is aannemelijk dat de chemische oxidatie van de aromaten nog aanhield in de reactor. Daarom is na 182 dagen besloten om het grondwater zoveel mogelijk uit te spoelen en over te gaan op doorstromen (5-20 ml/uur) met mineraal medium met sulfaat (Tabel 1). BTEX zijn initieel automatisch gedoseerd, maar dit bleek niet betrouwbaar in de reactor te stromen. Daarna zijn BTEX handmatig gedoseerd met ±100 µM per keer. Ter voorkoming van zuurstofproductie door fotosynthetiserende micro-organismen is de reactor ingepakt in aluminiumfolie en is een herbicide, diuron, gedoseerd aan de reactor. Zie tabel 2 voor een chronologisch overzicht van de werkzaamheden.

Daarnaast is een monster van 60 mL uit de BTEX reactor in de nitraatreducerende benzeenreactor gespoten. Na het op deze wijze bij-enten met de populatie micro-organismen uit de BTEX-reactor is vanaf dag 89 sulfaat in plaats van nitraat toegediend aan de benzeenreactor.

Tabel 2. Chronologisch overzicht van de werkzaamheden.		
Datum	Werkzaamheden	Motivatie
15-12-2022	Inoculatie BTEX-reactor met grondwater uit Eibergen	Start project
23-12-2023	BTEX-oplossing (in MeOH) en sulfaatoplossing aangesloten	Doseren van substraat
5-1-2023	pH-elektrode opnieuw gekalibreerd, pH in reactor was 9,68. Ook dO ₂ -sensor opnieuw gekalibreerd.	pH-elektrode initieel verkeerd gekalibreerd
23-1-2023	Gasleidingen en BTEX/SO ₄ -doseersysteem van reactor vervangen	Verhoogde zuurstofconcentratie in de reactor
16-2-2023	Gasleidingen vervangen op influentvat	Verhoogde zuurstofconcentratie in de reactor
24-2-2023	Grondwaterpomp uitgeschakeld	Het 20 litervat was leeggepompt
27-2-2023	Eerste keer inoculeren van benzeenreactor met monster (60 mL) uit BTEX-reactor	Introductie van micro-organismen uit Eibergen in de benzeenreactor
21-3-2023	Alle gaslekken in en rondom de BTEX-reactor zijn verholpen, reactor ondergedompeld ter bevestiging	BTEX-reactor bleek nog niet anaeroob
13-4-2023	Batches A&B gemaakt met elk ±100 mL BTEX-reactorculture	Uitgebreidere monitoring BTEX-afbraak in grondwater
21-4-2023	BTEX-oplossing vervangen voor pure BTEX (1:1:1:1/v:v:v:v), ook gedoseerd aan batches A&B	Slechte oplosbaarheid van vnl. ethylbenzeen en xylenen.
17-5-2023 & 25-5-2023	BTEX-doseerleidingen vervangen	Pure BTEX blijkt het doseersysteem op te lossen en te verstoppen
5-6-2023	Aanwezigheid persulfaat en (bacterio)chlorophyll A (fotosynthese) bevestigd in grondwater en reactor	Vermoedelijk zuurstofgeneratie en chemische oxidatie in de reactor
19-6-2023	Start doseren van diuron (herbicide) voor uitschakelen (bacterio)chlorophyll A	Stoppen van fotosynthese in de reactor
21-6-2023	BTEX-doseerleidingen vervangen, sulfaat-houdend kweekmedium aangesloten i.c.m. nieuwe pompplangen, herstart doorstroming BTEX-reactor	Pure BTEX blijkt het doseersysteem nog steeds op te lossen. Medium ter uitspoeling chemische oxidanten
26-6-2023	Batches C&D gemaakt met elk ±200 mL BTEX-reactorculture	Uitgebreidere monitoring BTEX-afbraak in grondwater met kweekmedium
29-7-2023	Tweede keer inoculeren van benzeenreactor met monster (60 mL) uit BTEX-reactor	Introductie van micro-organismen uit BTEX-reactor in de benzeenreactor
11-8-2023	Mediumpomp van BTEX-reactor uitgeschakeld	Het 20 litervat was voor 90% leeggepompt
27-9-2023	Batches E&F gemaakt met elk ±60 mL benzeenreactorculture	Eerste test voor TEX-afbraak door de micro-organismen uit de benzeenreactor
17-10-2023	Eerste BTEX-dosering aan benzeenreactor	Test voor TEX-afbraak, naast benzeenafbraak in de reactor

3.3 Stockoplossingen

Voor het maken van de steriele, anaerobe 10 mM oplossing van BTEX is met een gasdichte spuit 2 mL van een oplossing van 1 M benzeen, 1 M toluen, 1 M ethylbenzeen en 1 M xylenen (in gelijke verhouding para-, meta-, ortho-X) in methanol toegevoegd aan 200 mL anaeroob, geautoclaveerd water. Tijdens het incuberen als batch is besloten de BTEX-oplossing bij 37° en 150 rpm schudden te bewaren, om het aandeel opgeloste BTEX te verhogen. Voor de pure BTEX-oplossing is eenzelfde volume van elke component met een gasdichte spuit in een anaeroob flesje geïnjecteerd.

De pH van het grondwater in de BTEX-reactor is gecorrigeerd (tussen 6,50 en 7,50) met een steriele, anaerobe oplossing van 1 M Na₂CO₃ om een carbonaatbuffer te creëren met het CO₂ in de gasfase. Begin januari was de kabel van de pH-elektrode kapotgegaan, waardoor het leek dat de reactor sterk verzuurde en er te veel Na₂CO₃ was gedoseerd. Hierdoor was de pH van de reactor tijdelijk 9,7. Om sulfaatreducerende condities te stimuleren is incidenteel (voornamelijk na reactoronderhoud) 0,5 mM lactaat gedoseerd. Lactaat is namelijk een goed groeisubstraat voor veel sulfaat-reducerende bacteriesoorten.

3.4 Batches

Tijdens de batchfase zijn twee monsters van ±100 mL in twee anaerobe, steriele serumflesjes gebracht (batches A&B, op 13 april, 113 dagen na de start), als verlengde batchproef, ter behoud van de actieve biomassa en als extra bevestiging indien activiteit werd waargenomen. Tijdens het doorstromen met medium is dit herhaald met een groter monster (±200 mL elk, batches C&D, op 26 juni, 186 dagen na de start). Na het inoculeren van de benzeen-reactor zijn ook van die reactor twee monsters (±60 mL elk, batches E&F, op 27 september) als anaerobe batches geïncubeerd. Aan elk van deze batches zijn ook BTEX en sulfaat gedoseerd. Een foto van alle batches is weergegeven in Figuur 2.



Figuur 2. Foto van de voorbereide batchincubaties. Reactor #5 batch A&B worden in de hoofdttekst batches E&F genoemd.

3.5 Gaschromatografie

Voor het analyseren van de concentratie methaan, benzeen, toluen, ethylbenzeen, p-,m-xylenen en o-xyleen is minstens eenmaal per week handmatig een gasmonster uit de headspace van de bioreactor genomen. Hiervoor is met een glazen spuit en steriele naald door het septum van de bioreactor geprikt. Hierna is een 500 μ L monster geïnjecteerd in de Varian CP-3800 GC met Porabond Q kolom en FID detector. De oven verwarmt van 40 tot 250 graden en het programma duurt 25 minuten.

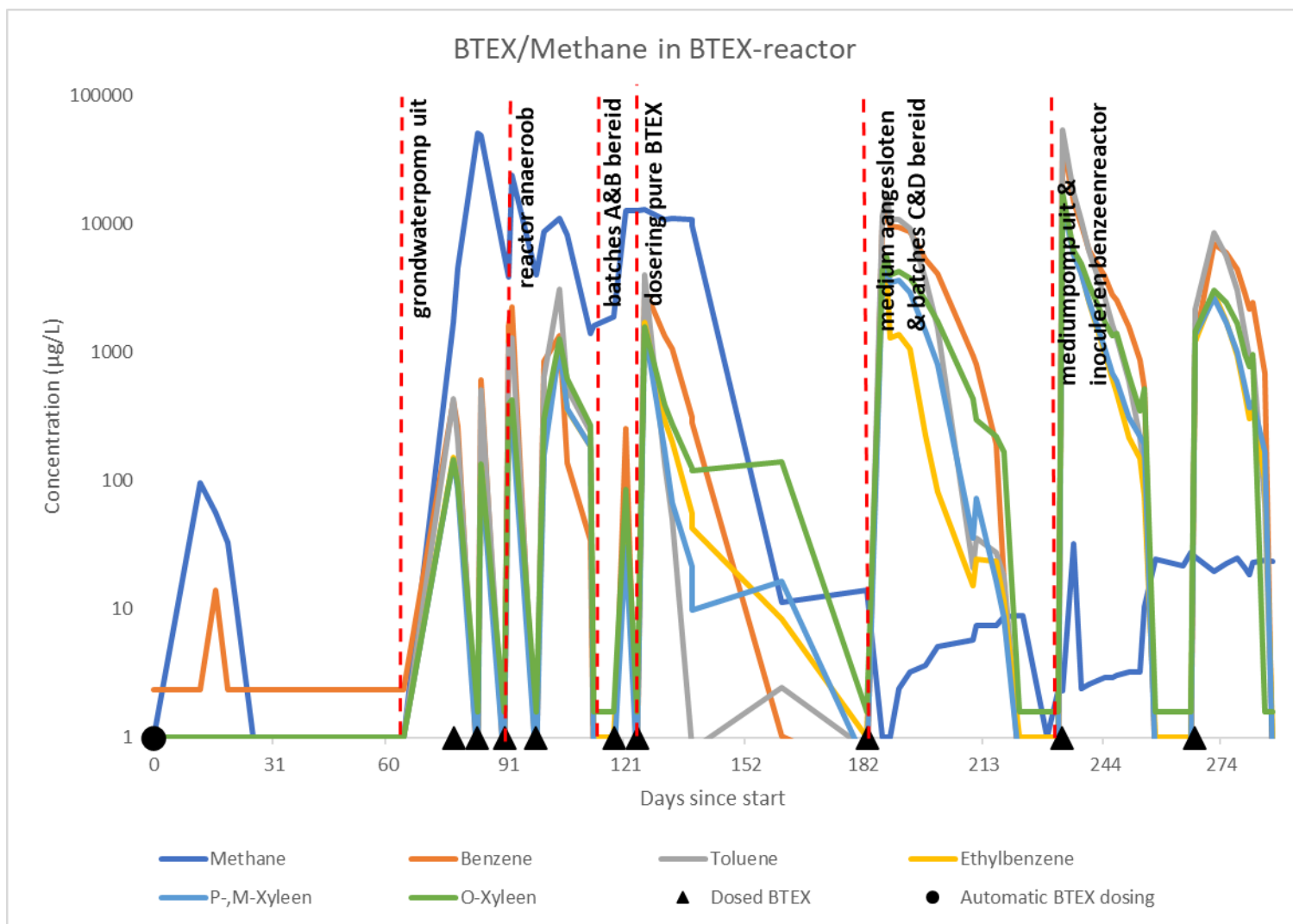
3.6 Colorimetrische assays

Voor het detecteren van de sulfideconcentratie is een 5 mL monster geanalyseerd met de methode van Pachmayr (1960). Voor het detecteren van de persulfaatconcentratie is 1 mL monster geanalyseerd met de methode van Liang et al. (2008). Voor het detecteren van (bacterio)chlorophyl A is 1 mL monster geanalyseerd met de methode van De Wit (1989).

4 Resultaten

4.1 BTEX-Reactor

Gedurende de incubatie zijn de concentraties BTEX en methaan regelmatig geanalyseerd. Deze data zijn weergegeven in Figuur 3. De hoge concentraties methaan tot ongeveer 150 dagen na de start zijn te verklaren door het doseren van de BTEX dat was opgelost in methanol. De methanol werd vermoedelijk als substraat gebruikt door methanogene micro-organismen.



Figuur 3. De concentraties benzeen, toluen, ethylbenzeen, xylene en methaan in de reactor, gedetecteerd met headspace GC-FID. Met driehoeken is aangegeven wanneer handmatig BTEX is toegevoegd.

Vanwege vermoedelijke aanwezigheid van persulfaat, zijn de reactor en de grondwaters van de verschillende locaties geanalyseerd op persulfaat. Dit bleek in lage concentratie (0,05 mM) aanwezig in de reactor en in verhoogde concentraties in grondwater van alle locaties: $\pm 0,25$ mM in Ede en Eibergen en 0,65-1,65 mM in Hoogeveen (zie Bijlage B). Omdat persulfaat i.c.m. calciumperoxide op deze locaties is toegediend voor het chemisch oxideren van BTEX, is de reactor nadien aangesloten op medium zonder chemisch oxidatieve stoffen.

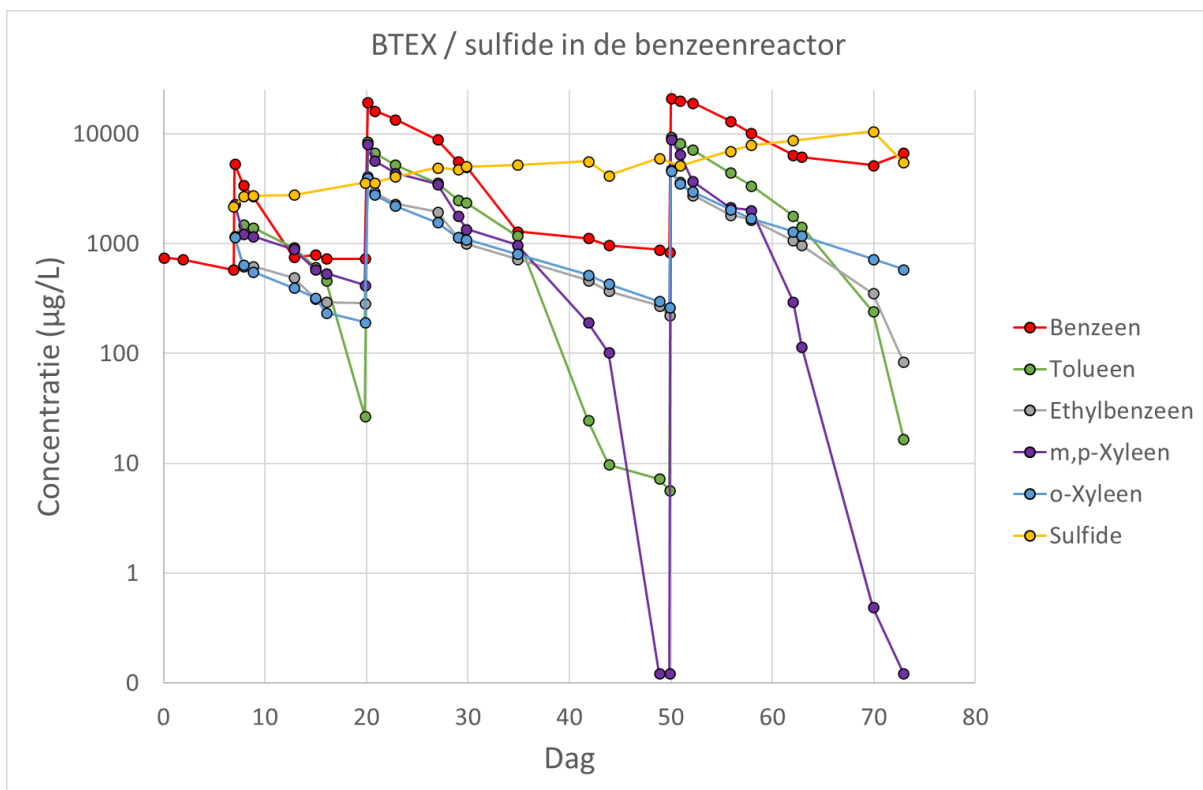
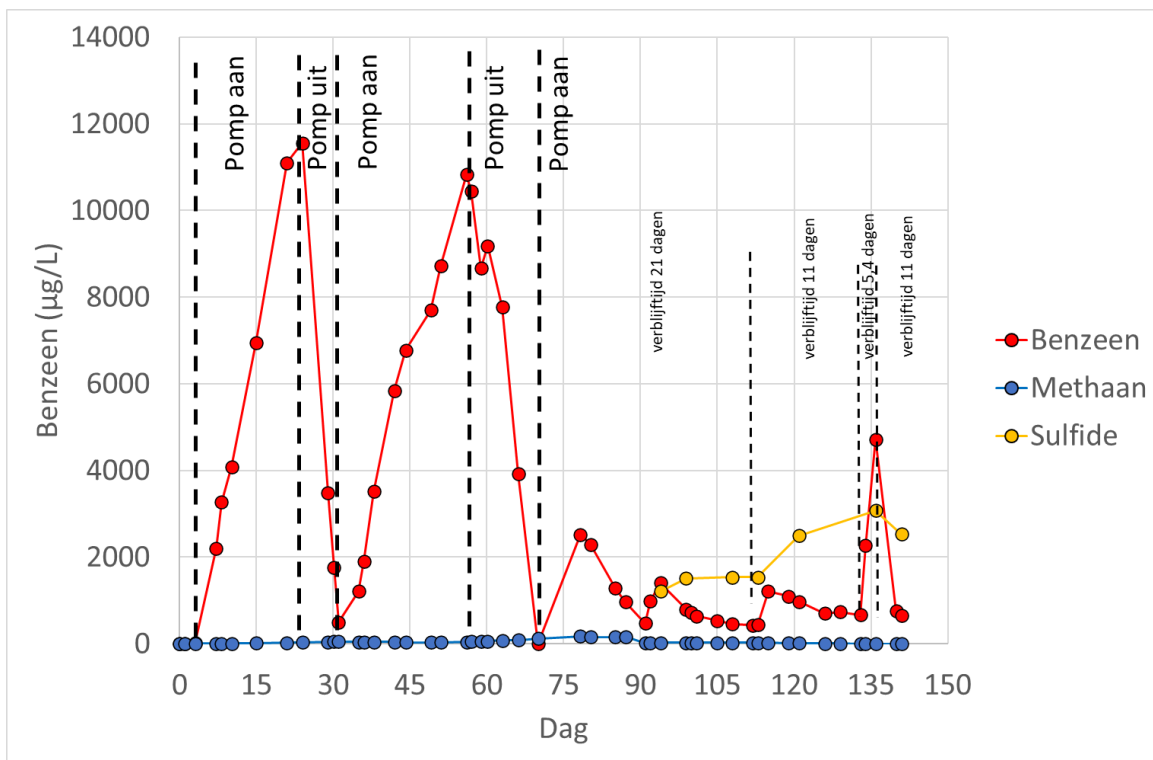
Gedurende de incubatie is eenmaal per maand de sulfideconcentratie bepaald, deze was altijd rond de detectielimiet van 10 μ M. Aan het begin van de incubatie, op 10 januari, en na drie maanden zijn de nitraat-, nitriet-, ijzer- en sulfaatconcentraties bepaald. Deze waren allen onder de detectielimiet van respectievelijk 10, 1, 200 en 3 mg/L.

Tijdens de batchfase waren de opgeloste hoeveelheid BTEX gerelateerd aan de redox in de reactor; wanneer BTEX niet aanwezig was, was de redox ± 100 mV. Wanneer BTEX aanwezig was, was de redox ± -300 mV.

4.2 Benzeenreactor

Omdat onduidelijk was waardoor de BTEX-afname in de BTEX-reactor precies kwam, is een monster van 60 mL uit de BTEX-reactor in de nitraat-reducerende benzeenreactor gespoten. Na bij-enten met de populatie micro-organismen uit de BTEX-reactor op dag 89 was het mogelijk om de benzeenreactor over te schakelen van nitraat op sulfaat als elektronenacceptor (Figuur 4 bovenste grafiek). De vorming van ca. 2.500 μ g/L sulfide toonde aan dat benzeenafbraak in de reactor gekoppeld is aan sulfaat-reductie. Het rendement van afbraak van de continu gedoseerde benzeenconcentratie van 28,7 mg/L was $98,0 \pm 0,5\%$, bij een hydraulische verblijftijd (HRT) van 21 dagen, en $96,8 \pm 0,4\%$ bij een HRT van 11 dagen. Bij een HRT van 5,4 dagen accumuleerde benzeen langzaam in de reactor, wat aangeeft dat deze verblijftijd te laag was voor het handhaven van de populatie sulfaat-reducerende benzeenafbrekers in de reactor.

Vervolgens is bij een HRT van 11 dagen met benzeen-houdend medium (influentconcentratie 28.700 μ g/L) drie keer een shot BTEX aan de reactor gedoseerd (Figuur 4 onderste paneel). De benzeenconcentratie daalde tijdens het experiment snel onder de continu gedoseerde concentratie van 28.700 μ g/L, wat aantoont dat het werd afgebroken in aanwezigheid van TEX. Na de BTEX- doseringen daalde de concentratie ortho-xyleen (o-X) in een tempo dat volgens uitspoeling zonder afbraak met het continu gedoseerde medium kan worden verwacht. In de experimentele periode van 73 dagen is na verloop van tijd de afname van benzeen-, toluen-, meta / para-xyleen- (m- / p-X) en ethylbenzeen sneller dan de uitspoeling, wat duidt op afbraak. Voor o-X-afbraak is mogelijk een langere adaptatieperiode nodig. Na BTEX-dosering was er een toename van de sulfideconcentratie van ongeveer 2.500 tot 10.500 μ g/L, wat duidt op afbraak met sulfaat.



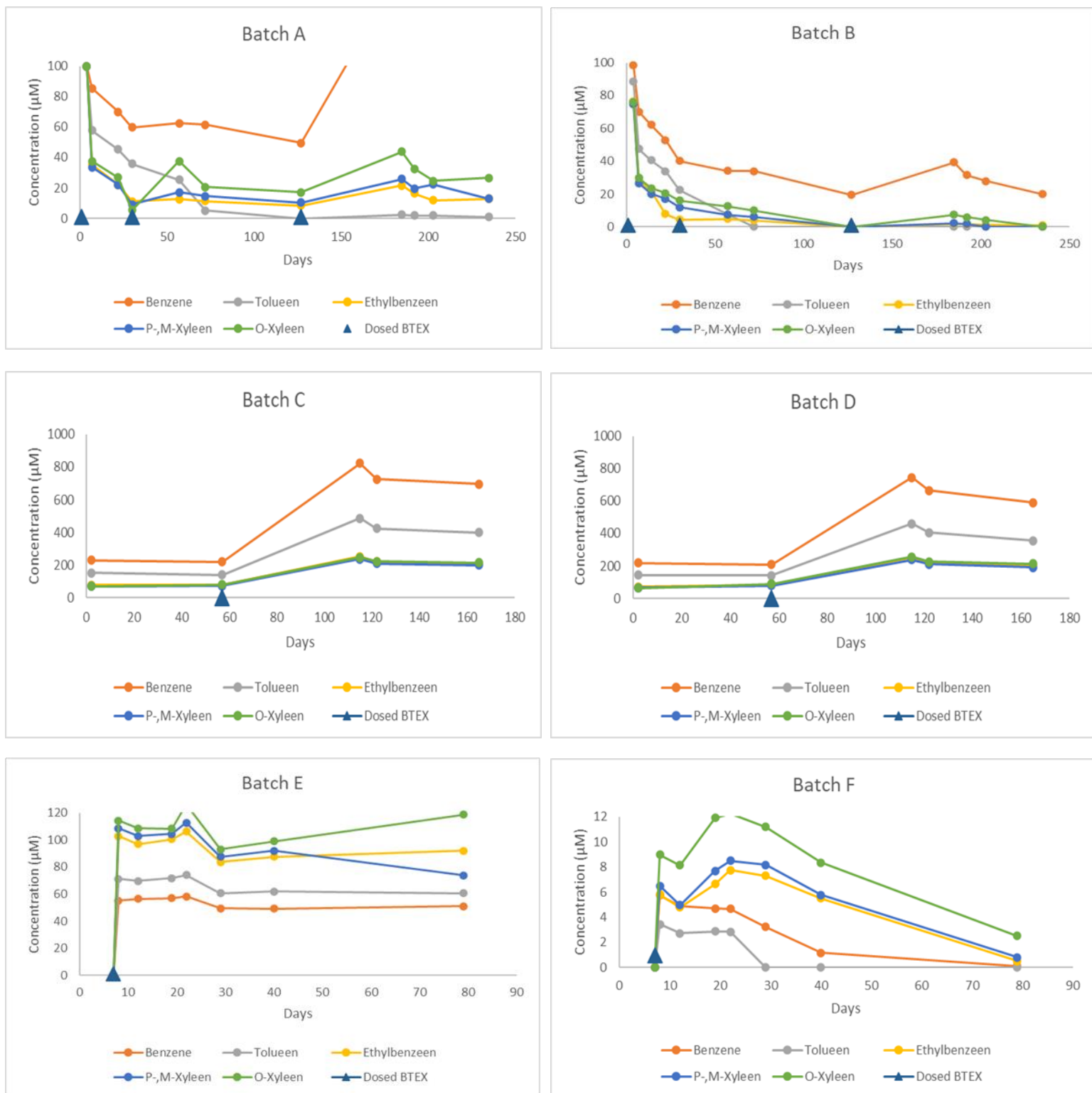
Figuur 4. Boven: Benzeen, methaan en sulfide in de benzeen-reactor. Op dag 89 is de reactor bij-geënt met 60 ml vloeistof uit de BTEX-reactor. Onder: De concentraties benzeen, toluene, ethylbenzeen, xylenen en sulfide in de reactor na 3x een shot BTEX aan de reactorvloeistof. De verlaging van de concentratie o-X is volgens uitspoeling zonder afbraak bij de HRT van 11 dagen. Omdat benzeen continu wordt gedoseerd, duidt een gelijkblijvende concentratie al op afbraak.

4.3 Batchincubaties

In batch A&B, gemaakt met grondwater uit de BTEX-reactor, werd initieel een sterke afname van de BTEX gedetecteerd. Hierna zijn nog tweemaal 100 μM BTEX toegevoegd. Na een maand zijn opnieuw BTEX gedoseerd, hiervan kon na drie maanden geen toluen meer worden gedetecteerd. De xylenen en ethylbenzeen waren in batch B niet meer detecteerbaar, in batch A nog aanwezig met 8-17 μM . In beide batches was nog 50 μM (A) en 20 μM (B) benzeen aanwezig. Op dat moment zijn opnieuw 100 μM BTEX toegevoegd. Na vier maanden zijn hiervan nog 20-115 μM benzeen, 0-1 μM toluen, 1-11 μM ethylbenzeen en 0-24 μM xylenen gedetecteerd. Op dat moment is ook 7,8-26,9 mg/L sulfide gedetecteerd in deze batches. De sulfidevorming is ook zichtbaar als zwarte neerslag in de middelste flesjes in figuur 1. De initiële BTEX-afbraak trad mogelijk op door nog in het grondwater aanwezige chemische oxidanten. Het feit dat na herhaalde dosering TEX verdween en sulfide werd gevormd wijst erop dat de micro-organismen in het grondwater van locatie Eibergen in staat zijn tot sulfaat-reducerende TEX-afbraak.

In batch C&D, gemaakt met medium uit de BTEX-reactor, zijn na twee maanden dezelfde concentraties BTEX gedetecteerd als oorspronkelijk toegevoegd ($\pm 250 \mu\text{M}$). Hierna zijn nogmaals BTEX gedoseerd ($\pm 500 \mu\text{M}$), deze zijn drie maanden later met ongeveer 10% in concentratie afgenomen. Sulfide is in deze batches niet gedetecteerd. Kennelijk hebben de micro-organismen van locatie Eibergen meer tijd nodig om te adapteren aan het gebruikte kweekmedium.

In batch E&F, gemaakt met medium uit de benzeenreactor, is individueel BTEX gedoseerd. Aan batch E zijn 100 μM BTEX toegevoegd, aan batch F slechts 5 μM BTEX. In Batch E zijn na 30 dagen de BTEX gemiddeld met ongeveer 10 μM afgenomen. Na 80 dagen is deze afname niet duidelijk doorgezet, behalve P-/M-xylenen, deze zijn met ongeveer 30 μM afgenomen. In batch F is na 80 dagen enkel nog 2,5 μM O-xyleen gedetecteerd. Er is ook 1,5-2,3 mg/L sulfide gedetecteerd in deze batches. In figuur 5 zijn de resultaten van alle batches weergegeven.



Figuur 5. BTEX-concentraties in de batches. De schaal is gelijkgesteld voor de duplo's A&B en C&D, bij E&F is een afwijkende y-schaal gebruikt.

5 Discussie

Op basis van de concentraties BTEX in de headspace van de reactoren kan geconcludeerd worden dat de BTEX in de BTEX-reactor in concentratie afnam. Omdat tijdens het automatisch doseren niet duidelijk was of de BTEX wel in de BTEX-reactor werd gedoseerd, maar mogelijk bij de injectie verloren ging naar de lucht, is tijdelijk overgegaan tot een batchincubatie (grondwater-/mediumpomp uitgeschakeld). Vooral tijdens deze batchfase is de afname van BTEX-concentraties telkens waargenomen. Echter, er is geen sulfidevorming gedetecteerd in de reactor. Ook namen de concentraties BTEX allemaal met ongeveer dezelfde snelheid af. Bij anaerobe biologische afbraak wordt meestal gezien dat de micro-organismen een voorkeur hebben voor bepaalde componenten. Hieruit volgt dat meestal de afbraaksnelheid van toluen het hoogst is en daarna die van xylenen, ethylbenzeen en benzeen (Callaghan, 2013).

Omdat in de BTEX-reactor alle verontreinigingscomponenten met ongeveer dezelfde snelheid in concentratie afnemen en hierbij geen sulfide of nitriet werd gevormd, kunnen we niet concluderen dat in de reactor biologische afbraak optrad. De aanvankelijke afname van BTEX-concentraties zou verklaard kunnen worden door de aanwezigheid van persulfaat en calciumperoxide in het grondwater dat als entmateriaal is gebruikt. De BTEX kan hierdoor ook chemisch geoxideerd zijn, of aeroob afgebroken met uit chemische oxidanten gevormde lage concentraties O_2 . De afname in BTEX-concentraties na doorstromen met medium is nog te verklaren door uitspoelen, maar na opnieuw stilzetten van de reactor treedt nog steeds concentratie-afname op. Omdat ook toen nog geen sulfidevorming optrad, kan niet worden bevestigd dat dit door afbraak met sulfaat komt.

De relatief hoge concentratie methaan in de headspace in de periode 70-160 dagen na de start, kan verklaard worden door het afbreken van de methanol waarin de BTEX is opgelost. Methanogene bacteriën staan erom bekend dat ze methanol kunnen omzetten in methaan (Ferguson & Mah, 1983). Dit houdt wel in dat er dus anaerobe micro-organismen aanwezig zijn in het grondwater en dat deze actief zijn. Ook toont het aan dat er geen significante concentraties moleculair zuurstof aanwezig waren (O_2) omdat methanogenen strikt anaeroob zijn. Ze lijken echter niet nodig voor de BTEX-afbraak, vanwege de aanwezigheid van chemisch oxiderende stoffen. De initiële BTEX-oplossing was gebaseerd op de oplosbaarheid van benzeen in water. Toluene, ethylbenzeen en xylenen zijn echter veel minder oplosbaar dan benzeen en zodoende kon niet met zekerheid bepaald worden wat de precieze opgeloste concentratie BTEX was in deze oplossing. Hierom is besloten vanaf 21 april te doseren met een pure BTEX-oplossing, waarbij alle componenten in gelijke verhouding in elkaar opgelost zijn, zonder water of andere oplosmiddelen.

In de batches die gemaakt zijn van het Eibergen-grondwater, kan op basis van de afname van, voornamelijk, TEX-concentraties en toename van sulfideconcentraties wel geconcludeerd worden dat er micro-organismen aanwezig zijn die onder sulfaat-reducerende condities TEX kunnen afbreken. Omdat in deze batches geen vers grondwater wordt aangevoerd, zijn naar verwachting de persulfaat en calciumperoxide na verloop van tijd weggeëgeerd. Hierna hebben de anaerobe micro-organismen de afbraak van de TEX overgenomen. In deze batches verloopt de afbraak het snelst voor toluene, daarna ethylbenzeen en xylenen en het langzaamste voor benzeen.

De batches die gemaakt zijn tijdens het doorstromen van de reactor met medium laten echter nog geen tekenen van biologische activiteit zien. Het is mogelijk dat de micro-organismen nog wel aanwezig zijn, maar in zulke lage concentraties, dat de afbraak nog niet snel genoeg gaat om het te detecteren gedurende dit project. Een andere verklaring kan zijn dat de micro-organismen nog verkeren in de zogenaamde lag-fase, waarin ze eerst moeten wennen aan de veranderde condities in het medium voordat ze actief worden. Omdat er überhaupt geen afname van BTEX-concentraties is gedetecteerd kan wel worden uitgesloten dat de chemische oxidatie nog heeft opgetreden nadat de reactor met medium is doorstroomd.

In de benzeenreactor werd (bij een hydraulische verblijftijd vanaf 11 dagen) geen accumulatie van benzeen gedetecteerd, ondanks de constante dosering van 28,7 mg/L benzeen. Na het 3 maal toedienen van een shot BTEX, bleek o-xyleen uit de reactor te verdwijnen met een snelheid die wijst op uitspoeling zonder afbraak. Het feit dat de concentraties benzeen, toluen, m-xyleen, p-xyleen, en ethylbenzeen sneller afnamen dan de uitspoelingsnelheid wijst op afbraak van deze stoffen. De toenemende sulfideconcentraties na BTEX-dosering bevestigen dat het hier gaat om sulfaat-reducerende afbraak.

Omdat in de batches die gemaakt zijn met materiaal uit de benzeenreactor volledige afbraak optreedt bij lage concentraties BTEX en bij hoge concentraties BTEX in ieder geval van P-/M-xylenen, terwijl sulfide wordt gevormd, zijn er duidelijke aanwijzingen dat de culture in de bioreactor in samenwerking met de culture uit het grondwater van Eibergen volledig BTEX kunnen afbreken onder sulfaat-reducerende condities.

6 Conclusies

In de BTEX-reactor is geen overtuigende biologische afbraak aangetoond. De concentraties namen wel af, maar voor de afzonderlijke componenten ongeveer even snel, wat niet duidt op anaerobe biologische processen, die normaal gesproken verschillen in afbraaksnelheid laten zien.

Mogelijke oorzaken van de gevonden concentratie-afnames in de BTEX-reactor zijn:

- Aanvankelijke chemische afbraak door nog steeds aanwezige restproducten van de uitgevoerde chemische oxidatie.
- Aerobe biologische afbraak met uit deze restproducten gevormde lage concentraties zuurstof waarmee aerobe afbraak plaatsvindt. Deze gaat sneller waardoor verschillen in afbraaksnelheid niet zichtbaar zijn.
- Uitspoeling als voornaamste proces tijdens het doorstromen van de reactor.
- Anaerobe afbraak, aan het eind van het experiment, als de restproducten van de chemische oxidatie zijn uitgespoeld en de reactor niet meer wordt doorstroomd met medium maar als batch wordt gebruikt. Er is echter geen sulfidevorming, waardoor afbraak met sulfaat niet kan worden bevestigd.

Overigens zullen de restproducten van de chemische afbraak en zuurstof tevens de anaerobe microbiële cultuur hebben aangetast tijdens het verblijf in het monstervat. Dit zal de enting van de reactor middels grondwater van de locatie hebben gefrustreerd. De concentratie-afnames aan het eind van het experiment, met uitgezette pomp, zijn nog niet verklaard.

In enkele batches zijn wel verschillen in afnamesnelheden per component gevonden, hetgeen wijst op anaerobe afbraak. Ook is daarin sulfidevorming waargenomen, wat duidt op gebruik van sulfaat bij die afbraak.

Ook in de benzeenreactor is op basis van concentratie-afnames van de vluchtige aromaten in combinatie met sulfidevorming biologische afbraak geconstateerd. Na overschakeling van nitraat naar sulfaat volgend op het doseren van Eibergen-grondwater namen concentraties van benzeen, toluen-, ethylbenzeen, meta- en para-xyleen namelijk af, waarbij sulfide werd gevormd. Er is alleen nog geen ortho-xyleenafbraak vastgesteld binnen de experimentele periode van 73 dagen.

7 Aanbevelingen

Vanwege de aangetoonde biologische activiteit kan worden geconcludeerd dat er sulfaat-reducerende BTEX-afbrekende micro-organismen aanwezig zijn op de chemisch-gesaneerde locatie in Eibergen. Het lijkt mogelijk deze te kweken. Aanbevolen wordt daarom de kweek op te schalen naar een reactor van 1 m³. Als het ook op die schaal lukt om een vitale bacteriecultuur te kweken die BTEX afbreekt, dan kan deze worden gebruikt voor bio-augmentatie. Dit kan ten behoeve van een biologische nabehandeling op locaties waar bodemsanering door middel van chemische oxidatie van vluchtige aromaten met persulfaat heeft plaatsgevonden. Ook is zo'n bacteriecultuur bruikbaar voor een volledig biologische sanering van met vluchtige aromaten verontreinigde locaties waar sulfaat in de bodem van nature voldoende aanwezig is of ingebracht wordt. Geadviseerd wordt voor het starten van de kweekmateriaal van de benzeenreactor te gebruiken.

Om het kweekproces te optimaliseren is het daarnaast raadzaam om te onderzoeken welke micro-organismen precies voor de afbraak verantwoordelijk zijn. Dit kan d.m.v. een metagenoomanalyse en/of 16S amplicon sequencing gecombineerd met een metabolietenanalyse.

In bodems zal minder inhibitie van microbiële processen door chemische oxidatie plaatsvinden dan ondervonden in de vaten, reactoren en batchflessen in het laboratorium. De nu in het lab bestudeerde processen vinden vanwege de heterogeniteit van bodems in het veld mogelijk naast elkaar plaats. Na het kweken van een BTEX-afbrekende cultuur wordt daarom veldonderzoek aanbevolen om te bepalen hoe lang chemische oxidatie nog doorwerkt – gezien de bevindingen bij de uitgevoerde experimenten is dat mogelijk veel langer dan gedacht – en in hoeverre daarnaast biologische afbraak plaatsvindt en of dat aerobe en/of anaerobe processen betreft. Op basis van de uitkomsten is vervolgens de gecombineerde chemische en biologische aanpak van vluchtige aromaten te optimaliseren. Geadviseerd wordt deze aanpak op de saneringslocaties waarvan voor dit onderzoek materiaal is verkregen, in Ede en Hoogeveen (op de locatie in Eibergen is de bodemsanering inmiddels afgerond), te testen.

8 Referenties

Atashgahi, S., Hornung, B., Van Der Waals, M. J., Da Rocha, U. N., Hugenholtz, F., Nijssse, B., Molenaar, D., Van Spanning, R., Stams, A. J. M., Gerritse, J., & Smidt, H. (2018). A benzene-degrading nitrate-reducing microbial consortium displays aerobic and anaerobic benzene degradation pathways. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22617-x>

Callaghan, A. V. (2013). Metabolomic investigations of anaerobic hydrocarbon-impacted environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 506-515. Doi: 10.1016/j.copbio.2012.08.012

Ferguson, T. J., & Mah, R. A. (1983). Effect of H₂-CO₂ on Methanogenesis from Acetate or Methanol in *Methanosarcina* spp. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 46(2).

Ferry, J. G. (2011). Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 351–357. Doi: 10.1016/j.copbio.2011.04.011

Liang, C., Huang, C. F., Mohanty, N., & Kurakalva, R. M. (2008). A rapid spectrophotometric determination of persulfate anion in ISCO. *Chemosphere*, 73(9), 1540–1543. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.08.043

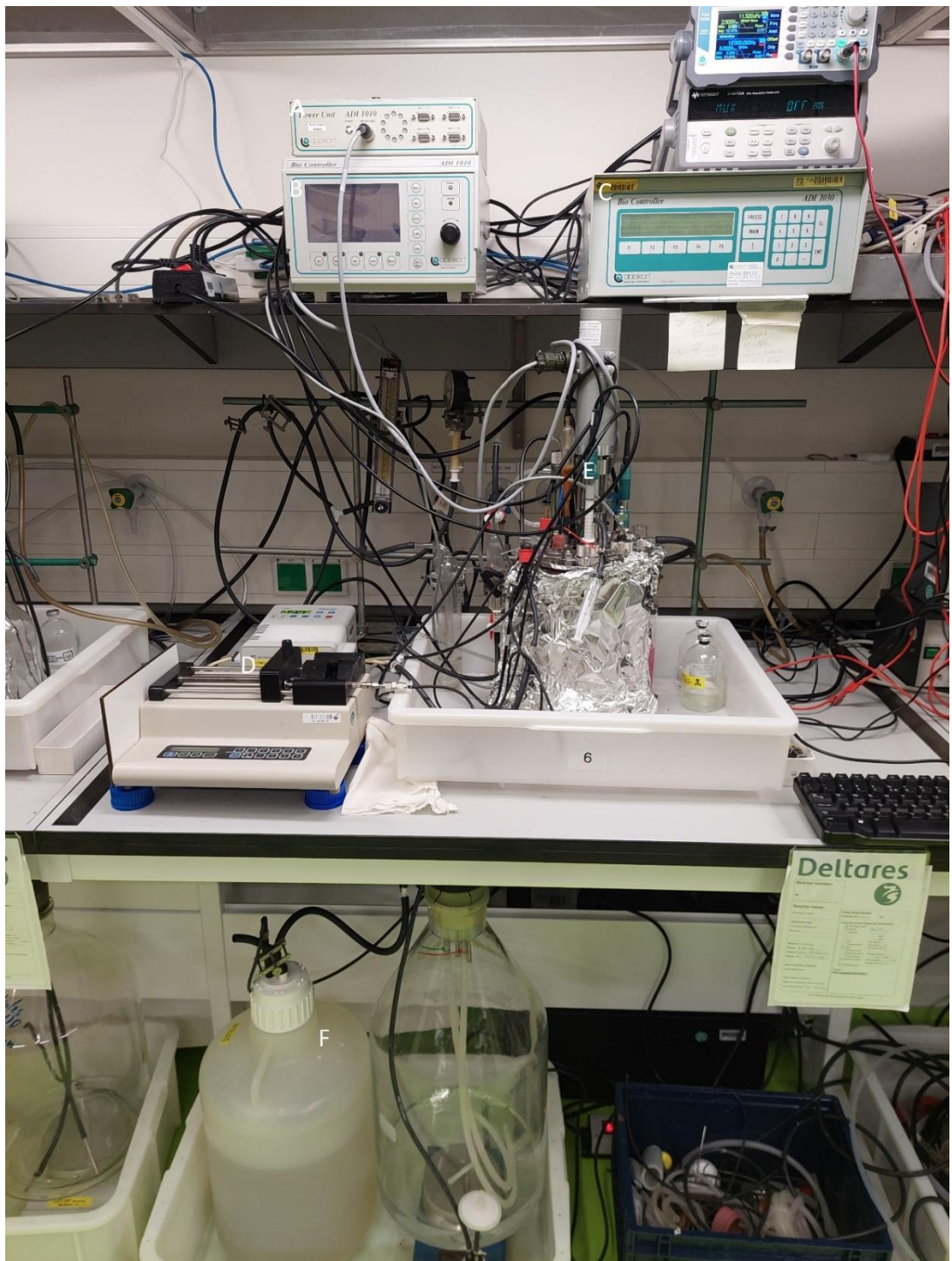
Pachmayr, F. (1960). *Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser*. Thesis. Univ. München.

Staats, M., Braster, M., & Röling, W. F. M. (2011). Molecular diversity and distribution of aromatic hydrocarbon-degrading anaerobes across a landfill leachate plume. *Environmental Microbiology*, 13(5), 1216-1227. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02421.x

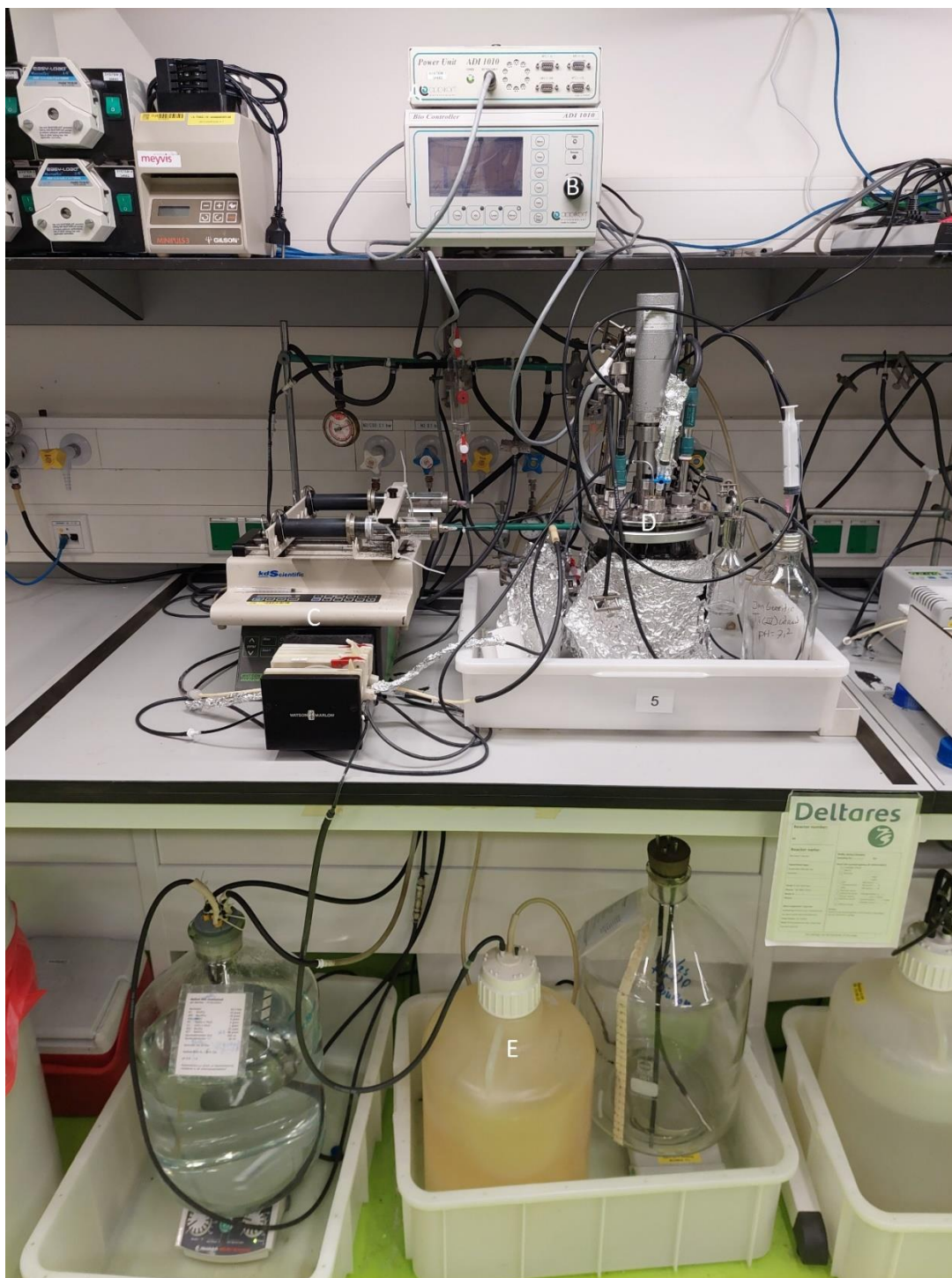
van der Waals, M. J., Atashgahi, S., da Rocha, U. N., van der Zaan, B. M., Smidt, H., & Gerritse, J. (2017). Benzene degradation in a denitrifying biofilm reactor: activity and microbial community composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5175–5188. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8214-8>

Wit, de R. (1989). Interactions between phototrophic bacteria in marine sediments, chapter 2. Thesis. Rijksuniversiteit Groningen.

A Foto's van de bioreactoren



Figuur A1. Overzicht van de BTEX-reactor. Deze reactor is gebruikt voor het inoculeren van grondwater uit Eibergen en daarna selectief opgroeien van sulfaatreducerende BTEX-afbrekende micro-organismen. A = stroomvoorziening roermotor, B = pH/dO₂/temperatuur/vloeistofniveau en roersnelheid monitoringskast, C = redox-monitoringskast, D = medium- en gassenpomp (achter) en BTEX/(SO₄) doseersysteem (voor), E = bioreactor, verduisterd met aluminiumfolie, F = influent- en effluentvaten.



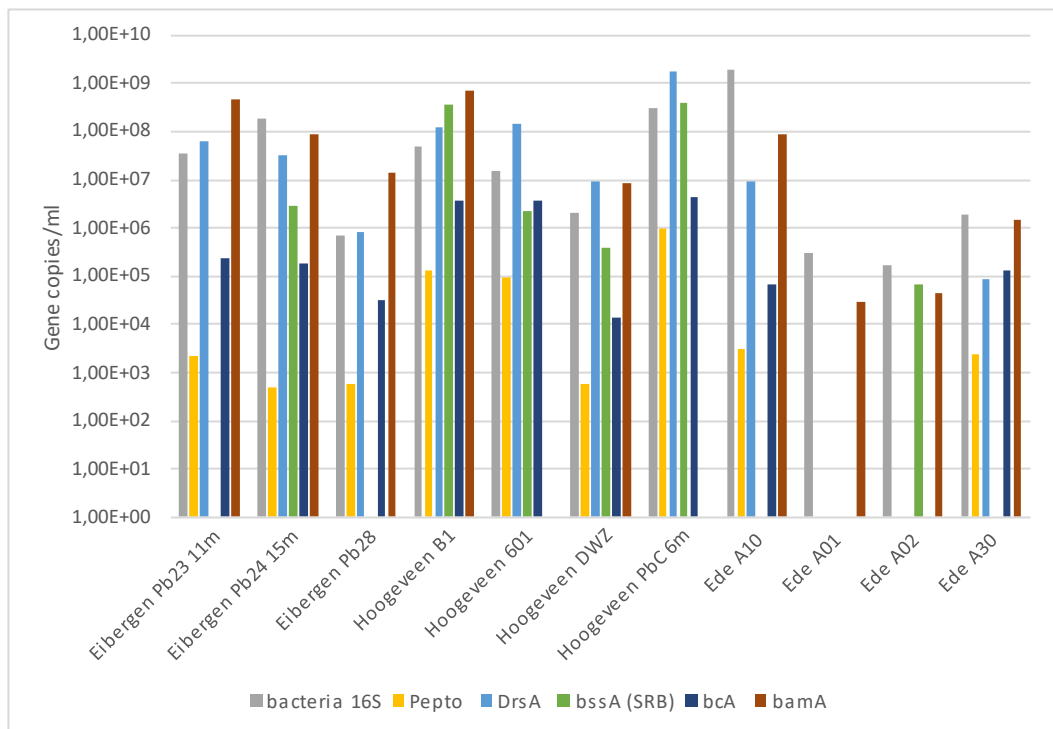
Figuur A2. Overzicht van de benzeenreactor. Deze reactor was ruim 20 jaar gebruikt voor een nitraat-reducerende benzeenafbrekende culture. Gedurende het project is deze overgezet op een sulfaat-reducerende benzeenafbrekende culture. A = stroomvoorziening roermotor, B = pH/dO₂/temperatuur/vloeistofniveau en roersnelheid monitoringskast, C = medium- en gassenpomp (onder) en benzeendoseersysteem (boven), D = bioreactor, verduisterd met aluminiumfolie, E = influent- en effluentvaten.

B Resultaten van vooronderzoek grondwater

Tabel B1. Genkopieën per mL grondwater van de genen (bepaald met qPCR): bacterieel 16S (indicatie aanwezige aantallen bacteriën), *Peptococcaceae* 16S (indicatie aanwezige aromatenafbrekende bacteriën), *DrsA* (sulfaatreductiegen), *bssA* (benzylsuccinaatsynthase; toluenaafbraakgen), *abcA* (benzeencarboxylase; benzeenaafbraakgen) en *bamA* (6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase; aromatenafbraak pathway biomarker gen)

Monster		genkopieën / gram grond					
Naam	Veldwaarneming	bacterieel 16S rRNA	Peptococcaceae 16S rRNA	<i>drsA</i>	<i>bssA</i> (SRB)	<i>abcA</i>	<i>bamA</i>
Eibergen Pb23 11m	geen geur	2,65E+07	1,66E+03	6,31E+07	1,00E+00	1,75E+05	4,79E+08
Eibergen Pb24 15m	geen geur	1,83E+08	2,55E+02	3,36E+07	2,98E+06	1,77E+05	8,44E+07
Eibergen Pb28	wit water	7,22E+05	2,84E+02	8,39E+05	1,00E+00	1,59E+04	1,37E+07
Hoogeveen B1 + 3001	geen geur	4,79E+07	1,28E+05	1,21E+08	3,59E+08	3,82E+06	6,97E+08
Hoogeveen 601	geen geur	1,58E+07	9,33E+04	1,42E+08	2,15E+06	3,84E+06	1,00E+00
Hoogeveen DW2	geen geur	2,09E+06	1,42E+02	9,21E+06	3,73E+05	3,44E+03	8,22E+06
Hoogeveen PbC 6m	benzinegeur, zwart	3,05E+08	1,01E+06	1,70E+09	3,85E+08	4,42E+06	1,00E+00
Ede A10	lichte benzinegeur	1,45E+09	1,59E+03	9,47E+06	1,00E+00	1,69E+04	8,68E+07
Ede A01	lichte scherpe geur	3,00E+05	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	7,22E+03
Ede A02	lichte scherpe geur	8,20E+04	1,00E+00	1,00E+00	6,65E+04	1,00E+00	2,18E+04
Ede A30	lichte scherpe geur	9,63E+05	2,33E+03	4,27E+04	1,00E+00	1,27E+05	1,42E+06

Figuur B1 Resultaten DNA-analyses grafisch weergegeven



Tabel B2. Concentraties organische stof als non-purgeable organic carbon en ionen bepaald met ionchromatografie in ppm en enkele metalen bepaald met ICP_OES in de geteste grondwatermonsters.

Monster	mg/l												
	Organische stof	Chloride	Nitriet	Nitraat	Sulfaat	Fosfaat	Natrium	Ammonium	Kalium	Magnesium	Calcium	Izer	Mangaan
Eibergen Pb23 11m	19	97	<0,01	0,07	1192	<0,05	428	<0,01	9	22	353	29	0,70
Eibergen Pb24 15m	34	14	<0,01	0,03	55	1,3	17	3,0	9	5	75	0,7	0,12
Eibergen Pb28	12	104	<0,01	0,01	248	0,24	97	1,7	3	8	162	1,8	0,41
Hoogeveen B1 + 3001	38	155	0,12	0,2	4465	<0,05	1565	<0,01	148	157	316	155	5,15
Hoogeveen 601	38	238	<0,01	0,2	61	0,8	307	8,8	25	13	22	28	0,74
Hoogeveen DW2	18	332	<0,01	0,03	159	<0,05	351	0,9	58	19	29	53	1,34
Hoogeveen PbC 6m	36	104	0,15	0,08	587	0,8	556	<0,01	44	44	61	5,8	1,16
Ede A10	13	13	0,03	0,08	0,44	1,0	18	1,7	6	3	17	2,7	0,40
Ede A01	52	7	0,52	38,2	1368	<0,05	394	<0,01	9	4	175	0,7	0,21
Ede A02	53	9	0,21	9,4	1317	<0,05	288	0,1	14	13	209	0,5	3,45
Ede A30	16	10	0,06	19,5	152	<0,05	47	0,7	4	1	21	5,0	1,25

Tabel B3. Overzicht van de gedetecteerde persulfaatconcentraties in de geteste grondwatermonsters en de reactor

Date	Sample	conc (mM)	mg/L
5-6-2023	Reactor 6	0,05	0,03
5-6-2023	Hoogeveenmix1	1,65	0,99
5-6-2023	Hoogeveenmix2	0,66	0,39
5-6-2023	Ede A01	0,04	0,02
5-6-2023	Ede A03	0,29	0,17
5-6-2023	Eibergen Pb28	0,25	0,15

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