In-situ Bioremediatie van petroleumkoolwaterstoffen

Code van Goede Praktijk

OPENBARE AFVALSTOFFENMAATSCHAPPIJ VOOR HET VLAAMSE GEWEST

OVAM, uw beleidspartner in afval en bodem

Documentbeschrijving

OPENBARE AFVALSTOFFENMAATSCHAPPIJ
VOOR HET VLAAMSE GEWEST

1. Titel publicatie

In-situ Bioremediatie van Petroleumkoolwaterstoffen Code van Goede Praktijk

2. Uitgever

Openbare Afvalstoffenmaatschappij voor het Vlaamse Gewest

3. Publicatienummer

D/2005/5024/15

4. Publicatiereeks

Achtergronddocumenten bodemsanering

5. Trefwoorden

Bodemsaneringswerken, in-situ, bioremediatie, bioventing,

biosparging, biorestauratie, infiltratie

6. Aantal blz.

125

7. Aantal tabellen en figuren

84

8. Datum publicatie

Mei 2005

*9. Prijs**

n.v.t.

10. Samenvatting

Dit rapport behandelt de sanering van petroleumkoolwaterstoffen in de bodem door in-situ bioremediatie. De algemene pricipes van biologische afbraak en de verschillende methodes waarin deze kan worden aangewend worden eerst besproken. De richtlijnen van OVAM voor acceptatie van bioremediatie als voorkeursvariant en de monitoringsactiviteiten die hierbij dienen te worden uitgevoerd vervolledigen het document. Tot slot worden twee voorbeelden toegelicht.

11. Begeleidingsgroep

Openbare Afvalstoffenmaatschappij voor het Vlaamse Gewest (OVAM), Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO)

12. Contactperso(o)n(en)

Filip De Naeyer - Patrick Ceulemans - Tim Gregoir

13. Andere titels over dit onderwerp

Gegevens uit dit document mag u overnemen mits duidelijke bronvermelding.

De meeste OVAM-publicaties kan u raadplegen op de OVAM-website : http://www.ovam.be

Verantwoordelijke uitgever: Herman Gobel

.

INHOUD

SAMENVATTING **1**

1 INLEIDING **2**

1.1 PETROLEUMKOOLWATERSTOFFEN IN HET MILIEU 2
1.2 EIGENSCHAPPEN VAN PETROLEUMKOOLWATERSTOFFEN 2
1.2.1 Chemische samenstelling *2*
1.2.2 Olieproducten *3*
1.2.3 Fysische eigenschappen en gedrag in het milieu *4*

2 BIOLOGISCHE AFBRAAK VAN PETROLEUMKOOLWATERSTOFFEN **6**

2.1 ALGEMENE ASPECTEN 6
2.1.1 Micro-organismen: bacteriën en schimmels *6*
2.1.2 Nutriënten *7*
2.1.3 Vochtgehalte *7*
2.1.4 Concentraties, toxiciteit *7*
2.1.5 Zuurtegraad *7*
2.1.6 Biobeschikbaarheid *8*
2.2 BIODEGRADATIE ONDER AËROBE OMSTANDIGHEDEN 8
2.2.1 n-Alkanen *9*
2.2.2 Vertakte alkanen en cycloalkanen *10*
2.2.3 Cycloalkanen *10*
2.2.4 Alkenen *10*
2.2.5 Monoaromatische koolwaterstoffen (BTEX) *10*
2.3 BIODEGRADATIE VAN PETROLEUMKOOLWATERSTOFFEN IN ZUURSTOFLOZE OMSTANDIGHEDEN 15
2.3.1 Nitraatreducerende omzettingen *15*
2.3.2 IJzerreducerende omzettingen *15*
2.3.3 Sulfaatreducerende en methanogene omzettingen *16*
2.4 TUSSENPRODUCTEN DOOR ONVOLLEDIGE MICROBIËLE OMZETTING 19
2.5 BIODEGRADATIE VAN TRIMETHYLBENZENEN (TMB) 19
2.6 BIODEGRADATIE VAN MTBE 19
2.7 BIODEGRADATIE VAN POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOOLWATERSTOFFEN (PAK) 20

3 METHODEN VOOR IN-SITU BIOREMEDIËRING **23**

3.1 BIORESTAURATIE DOOR INFILTRATIE 23
3.1.1 Techniekbeschrijving *23*
3.1.2 Toepassingsgebied *26*
3.1.3 Verontreinigingen *26*
3.1.4 Beperkingen *26*
3.2 BIOVENTING 28
3.2.1 Techniekbeschrijving *28*
3.2.2 Toepassingsgebied *29*
3.2.3 Met bioventing behandelbare verontreinigingen *30*
3.3 BIOSPARGING 31
3.3.1 Techniekbeschrijving *31*
3.3.2 Toepassingsgebied *32*
3.3.3 Verontreinigingen *32*
3.3.4 Beperkingen *32*
3.4 BIOSLURPING 33
3.4.1 Techniekbeschrijving *33*
3.4.2 Toepassingsgebied *33*

3.4.3 Verontreinigingen geschikt om te worden aangepakt via bioslurping *33*
3.5 BIOAUGMENTATIE 34
3.5.1 Techniekbeschrijving *34*
3.5.2 Toepassingsgebied *35*
3.5.3 Verontreinigingen waarvoor bioaugmentatie kan worden overwogen *35*
3.6 BIOSCHERMEN 36
3.6.1 Techniekbeschrijving *36*
3.6.2 Verontreinigingstypes saneerbaar via bioschermen *36*
3.6.3 Toepassingsgebied *37*
3.7 FYTOREMEDIATIE 37
3.7.1 Techniekbeschrijving *37*
3.7.2 Toepassingsgebied *38*
3.7.3 Verontreinigingen die met fytoremediatie kunnen worden gesaneerd *39*

4 RICHTLIJNEN VOOR UITWERKING VAN EEN BIOREMEDIATIEVARIANT IN BODEMSANERINGSPROJECTEN 40

4.1 ALGEMENE ASPECTEN 40
4.2 HAALBAARHEIDSONDERZOEK 44
4.2.1 Aërobe biodegradatietest *44*
4.2.2 Anaërobe batchtest *46*
4.2.3 Laboratoriumtesten op grotere schaal *46*
4.2.4 Veldtesten: in-situ respiratietest *47*
4.2.4.1 In-situ respiratietest in de onverzadigde zone 47
4.2.4.2 Push-pull-test voor de verzadigde zone 48
4.2.4.3 Start-stop test voor de evaluatie van biosparging 48
4.2.4.4 In-situ microcosmos test 48
4.2.5 Checklist haalbaarheid bioremediatie door extractie/infiltratie *48*
4.2.6 Checklist haalbaarheid bioventing/biosparging *50*
4.3 ONTWERP FULL-SCALE BIOREMEDIATIEVARIANT 51

5 OPVOLGING VAN BIOREMEDIATIE: PRINCIPES 53

5.1 INLEIDING 53
5.2 MILIEUPARAMETERS 53
5.3 BODEMKWALITEITPARAMETERS 54
5.4 INDICATIEVE PARAMETERS VOOR BIODEGRADATIE 54
5.4.1 Bacterietellingen *55*
5.4.2 Erfelijk materiaal *55*
5.4.3 Fosfolipiden *56*
5.4.4 ATP *56*
5.4.5 Enzymatische activiteit *56*
5.4.6 Analyse van stabiele koolstofisotopen ($^{12}C/^{13}C$) *56*
5.4.6.1 Isotopenschift in TIC/CO_2 56
5.4.6.2 Isotopenschift van de polluent 57
5.4.7 Biomerkers *57*
5.4.8 Metabolieten *57*
5.4.9 Verzadigd/aromatisch/polair verhouding *58*
5.4.10 Alkaliniteit en geleidbaarheid van het grondwater *58*
5.4.11 Temperatuurverhoging *58*
5.4.12 Geochemische indicatoren *58*
5.5 KWANTITATIEVE PARAMETERS VOOR BIODEGRADATIE 59
5.5.1 In-situ respiratietesten *59*
5.5.2 In-situ mesocosm test *59*
5.5.3 Snelheid van respiratie van alternatieve elektronacceptoren en vorming van metabolieten *59*
5.6 OPERATIONELE PROCESPARAMETERS BIJ DE MONITORING VAN BIOREMEDIATIE .. 60

5.6.1 Inleiding ... *60*
5.6.2 Biorestauratie door infiltratie ... *60*
5.6.3 Bioventing ... *63*
5.6.4 Biosparging ... *64*
5.6.5 Bioschermen ... *67*
5.6.6 Andere bioremediatievarianten ... *67*

6 LITERATUUR ... 68

7 APPENDIX 1: BIOREMEDIATIEVOORBEELD 1 ... 73

7.1 SAMENVATTING ... 73
7.2 INLEIDING ... 74
7.3 UITGEVOERDE VELDWERKZAAMHEDEN ... 75
7.3.1 Indicatieve parameters voor biodegradatie ... *75*
7.4 OPERATIONELE PROCESPARAMETERS ... 77
7.5 UITVOERING VELDWERK ... 77
7.5.1 Vaststellen nulsituatie (2/10/2000) ... *77*
7.5.2 Volgende bemonsteringsrondes grondwater ... *78*
7.6 RESULTATEN ... 78
7.6.1 Vaststelling nulsituatie (02/10/2000) ... *78*
7.6.2 Operationele parameters (uitgevoerd door aannemer) ... *79*
7.6.3 Meetcampagne 2 (23/11/2000) ... *80*
7.6.4 Meetcampagne 3 (14/03/2001) ... *81*
7.6.5 Meetcampagne 4 (02/08/2001) ... *82*
7.6.6 Meetcampagne 5 (12/12/2001) ... *82*
7.6.7 Resultaten primaire verontreinigingsparameters (per peilbuis voor de verschillende meetrondes) ... *83*
7.7 BESPREKING ... 93
7.7.1 Bacterietellingen ... *94*
7.7.2 Analyse van stabiele koolstofisotopen ($^{13}C/^{12}C$) ... *98*
7.7.3 Relatieve afbraaksnelheden aromaten ... *98*
7.7.4 Metabolieten ... *100*
7.7.5 Alkaliniteit en geleidbaarheid van het grondwater ... *100*
7.7.6 Nutriënten ... *102*

8 APPENDIX 2: BIOREMEDIATIEVOORBEELD 2 ... 103

8.1 SAMENVATTING ... 103
8.2 ACHTERGRONDINFORMATIE ... 103
8.2.1 Controle en bemonstering van enkele relevante peilbuizen ... *104*
8.2.2 Saneringssysteem ... *106*
8.3 PLAATSING MESOCOSMS ... 108
8.4 OLIEKARAKTERISATIE ... 109
8.4.1 Oliegehalte en samenstelling (alifaten/aromaten en stofgroepen) ... *109*
8.5 GEDRAG VAN DE OLIE EN VOORSPELDE SANEERBAARHEID ... 111
8.6 RESULTATEN VELDOPVOLGING ... 112
8.6.1 Bemonstering en analyses mesocosms ... *112*
8.6.2 Microbiële populatie analyse van mesocosms in functie van tijd ... *115*
8.6.3 Staalname grondwater uit peilbuizen en mesocosms ... *117*
8.6.4 Monitoringsresultaten begeleidende EBSD ... *122*
8.7 TOETSING VAN DE BIOREMEDIATIEVARIANT AAN DE CRITERIA VOOR ACCEPTATIE 123

Tabellen

TABEL 1. EIGENSCHAPPEN VAN DE BELANGRIJKSTE OLIEPRODUCTEN 3
TABEL 2. INDICATIEF OPNAMEVERMOGEN (RETENTIECAPACITEIT, IN MG/KG) VAN BODEMS VOOR BRANDSTOFPRODUCTEN (NOBIS, 1997) 5
TABEL 3. ALGEMENE EIGENSCHAPPEN VAN DE 6 BTEX-AROMATEN..... 12
TABEL 4. OVERZICHT VAN ENKELE BACTERIE- EN SCHIMMELSOORTEN DIE BTEX-COMPONENTEN AËROOB KUNNEN METABOLISEREN (RISER-ROBERT, 1998)..... 13
TABEL 5. ANAËROBE BTEX-AFBREEKBAARHEID 16
TABEL 6. OVERZICHT VAN MICRO-ORGANISMEN DIE DE CAPACITEIT HEBBEN OM BTEX-COMPONENTEN TE TRANSFORMEREN/METABOLISEREN IN AFWEZIGHEID VAN VRIJE ZUURSTOF. 18
TABEL 7: SAMENVATTENDE TABEL CRITERIA VOOR ACCEPTATIE BIOREMEDIATIEVARIANT43
TABEL 8. CHECKLIST HAALBAARHEID BIOREMEDIATIE DOOR EXTRACTIE/INFILTRATIE 49
TABEL 9. CHECKLIST VAN GEGEVENS DIE BESCHIKBAAR MOETEN ZIJN OM DE TOEPASBAARHEID VAN BIOVENTING/BIOSPARGING TE KUNNEN VASTSTELLEN..... 50
TABEL 10. CHECKLIST VOOR OPVOLGING VAN BIOREMEDIATIE D.M.V. EXTRACTIE EN (HER)INFILTRATIE..... 62
TABEL 11 CHECKLIST VOOR OPVOLGING VAN BODEMSANERING MET BIOVENTING 65
TABEL 12 CHECKLIST VOOR OPVOLGING VAN BODEMSANERING MET BIOSPARGING..... 66
TABEL 13. VELDMETINGEN 78
TABEL 14. SECUNDAIRE PARAMETERS VOOR BIODEGRADATIE 78
TABEL 15. PLC-GROEPSVERDELING VAN BIOSPARGEPUNTEN 79
TABEL 16. INJECTIEDRUKKEN EN -DEBIETEN..... 80
TABEL 17. GRONDWATERSTAND VOOR EN TIJDENS SPARGING..... 80
TABEL 18. VELDMETINGEN 80
TABEL 19. SECUNDAIRE PARAMETERS VOOR BIODEGRADATIE 81
TABEL 20. VELDMETINGEN 81
TABEL 21. SECUNDAIRE PARAMETERS VOOR BIODEGRADATIE 81
TABEL 22. VELDMETINGEN 82
TABEL 23. SECUNDAIRE PARAMETERS VOOR BIODEGRADATIE 82
TABEL 24. VELDMETINGEN 82
TABEL 25. SECUNDAIRE PARAMETERS VOOR BIODEGRADATIE 83
TABEL 26. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 102..... 84
TABEL 27. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 100..... 85
TABEL 28. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 110..... 86
TABEL 29. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 150..... 87
TABEL 30. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 151..... 88
TABEL 31. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 152..... 89
TABEL 32. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 153..... 90
TABEL 33. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 106..... 91
TABEL 34. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 155..... 92
TABEL 35. ANALYSERESULTATEN PEILBUIS 201..... 93
TABEL 36. RESULTATEN BACTERIETELLINGEN (AANTAL PER GRAM GROND) IN BODEMSTALEN GENOMEN T.H.V. PB 110-201. 94
TABEL 37. VELDPARAMETERS GRONDWATER – JUNI 2003 105
TABEL 38. ANALYSERESULTATEN MINERALE OLIE 105
TABEL 39. SANERINGSSYSTEEM 106
TABEL 40. VELDGEGEVENS MESOCOSMPEILBUIZEN (DAG VAN PLAATSING – 17/7/03) 108
TABEL 41. SAMENSTELLING NAAR STOFGROEPEN VAN DE OLIE IN HET GRONDSTAAL... 109
TABEL 42. SAMENSTELLING NAAR STOFGROEPEN VAN DE OLIE..... 109
TABEL 43. SAMENSTELLING VAN DE OLIE NAAR TPH FRACTIES. 110
TABEL 44. VOORSPELDE FYSICO-CHEMISCHE PARAMETERS VAN DE OLIE 111
TABEL 45. AËROBE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID ONDER OPTIMALE OMSTANDIGHEDEN 112

TABEL 46. AQUIFERANALYSES JULI 2003 113
TABEL 47. GRONDWATER ANALYSES JULI 2003 113
TABEL 48. EVOLUTIE VAN PARAMETERS GEANALYSEERD OP MESOCOSME STALEN IN B3 (MESO 1) 114
TABEL 49.: EVOLUTIE VAN PARAMETERS GEANALYSEERD OP MESOCOSME STALEN IN B4 (MESO 2) 114
TABEL 50. EVOLUTIE VAN PARAMETERS GEANALYSEERD IN GRONDWATER MONSTERS UIT PEILBUIS B3 114
TABEL 51.: EVOLUTIE VAN PARAMETERS GEANALYSEERD IN GRONDWATER MONSTERS UIT PEILBUIS B4 114
TABEL 52. HETEROTROFE EN OLIE-AFBREKENDE CFU IN VERZADIGDE EN ONVERZADIGDE BODEMSTALEN B1, B2, B3 EN B4 OP T0 (JULI 2003) 116
TABEL 53. VELDPARAMETERS 118
TABEL 54. MINERALE OLIE CONCENTRATIES VAN GRONDWATERSTALEN UIT VERSCHILLENDE PEILBUIZEN 120
TABEL 55. HETEROTROFE EN OLIE-AFBREKENDE CFU IN GRONDWATER STALEN UIT BEMONSTERDE PEILBUIZEN IN FUNCTIE VAN DE TIJD. 122
TABEL 56. OPVOLGING MINERALE OLIE IN GROND DOOR EDSB (0,5-1,5 M-MV.; MENGSTALEN VAN 2 À 4 BORINGEN) (MG/KG DS) 122
TABEL 57. OPVOLGING MINERALE OLIE IN GRONDWATER DOOR EBSD (µG/L) 123
TABEL 58: SAMENVATTENDE TABEL CRITERIA VOOR ACCEPTATIE BIOREMEDIATIEVARIANT 124
TABEL 59. CHECKLIST VAN GEGEVENS DIE BESCHIKBAAR MOETEN ZIJN OM DE TOEPASBAARHEID VAN BIOVENTING/BIOSPARGING TE KUNNEN VASTSTELLEN..... 125

Figuren

FIGUUR 1: INCORPORATIE VAN ZUURSTOF TIJDENS AËROBE AFBRAAK VAN BENZEEN..... 13
FIGUUR 2: AËROBE AFBRAAKWEGEN VOOR TOLUEEN. 14
FIGUUR 3. ANAËROBE AFBRAAK VAN BTEX (THE UNIVERSITY OF MINNESOTA BIOCATALYSIS/BIODEGRADATION DATABASE; HTTP://UMBBD.AHC.UMN.EDU/)..... 18
FIGUUR 4. AËROOB AFBRAAKMECHANISME VAN MTBE. 21
FIGUUR 5. MOGELIJKE AËROBE AFBRAAKROUTES VOOR FENANTHREEN (UIT: "THE UNIVERSITY OF MINNESOTA BIOCATALYSIS/BIODEGRADATION DATABASE") 22
FIGUUR 6. PROEFOPSTELLING AËROBE BIOREMEDIATIETEST MET RESPIROMETER. 45
FIGUUR 7. CONTINUE METING VAN ZUURSTOF- EN KOOLZUURGASCONCENTRATIES TIJDENS RESPIROMETERTEST. 45
FIGUUR 8. UITVOERING VAN EEN IN-SITU RESPIRATIETEST. 47
FIGUUR 9. SITUATIETEKENING MET AANDUIDING VAN PEILBUISLOCATIES, SPARGEPUNTEN EN DE EVOLUTIE VAN DE PRIMAIRE BTEX-VERONTREINIGINGSPARAMETERS..... 95
FIGUUR 10. MET SURFER GEÏNTERPOLEERD BEELD VAN DE SITUATIE (BTEX-CONCENTRATIES IN DE MONITORINGSPEILBUIZEN) BIJ HET BEGIN VAN DE BIOSPARGINGSANERING T.O.V. HET EINDE ERVAN. 96
FIGUUR 11. MET SURFER GEÏNTERPOLEERD BEELD VAN DE SITUATIE (TRIMETHYLBENZEEN-CONCENTRATIES IN DE MONITORINGSPEILBUIZEN)BIJ HET BEGIN VAN DE BIOSPARGINGSANERING T.O.V. HET EINDE 97
FIGUUR 12.VERBAND TUSSEN DE $^{12}C/^{13}C$ ISOTOPENSHIFT EN HET DIC-GEHALTE IN DE MONITORINGSPEILBUIZEN. 98
FIGUUR 13. VERLOOP VAN DE VERHOUDING VAN DE CONCENTRATIES AAN T, E EN X T.O.V. DE CONCENTRATIES AAN 1,3,5 TMB EN 1,2,4 TMB VOOR PEILBUIS 102. ... 99
FIGUUR 14. VERLOOP VAN DE VERHOUDING VAN DE CONCENTRATIES AAN T, E EN X T.O.V. DE CONCENTRATIES AAN 1,3,5 TMB EN 1,2,4 TMB VOOR PEILBUIS 110. ... 99
FIGUUR 15. GEMIDDELD VERLOOP VAN DE EC EN VAN HET DIC-GEHALTE IN DE MONITORINGSPEILBUIZEN ALS FUNCTIE VAN DE TIJD. 100

FIGUUR 16. VERLOOP VAN DE PARAMETERS ALKALINITEIT, DOC, FENOLINDEX EN DIC ALS FUNCTIE VAN HET VERLOOP VAN DE PRIMAIRE VERONTREINIGINGSPARAMETERS VOOR PEILBUIZEN 102 EN 110. 101
FIGUUR 17. VERLOOP VAN DE GEMIDDELDE O_2-GEHALTEN (LINKS) EN REDOXPOTENTIAAL (RECHTS) IN DE MONITORINGSPEILBUIZEN ALS FUNCTIE VAN DE TIJD. DE VERTICALE LIJNEN GEVEN DE STANDAARD DEVIATIE WEER OP DE GEMIDDELDEN. 101
FIGUUR 18. VASTGESTELD VERBAND TUSSEN DE GEMETEN REDOXPOTENTIAAL EN HET ZUURSTOFGEHALTE VAN HET GRONDWATER IN DE MONITORINGSPEILBUIZEN. 102
FIGUUR 19. OVERZICHTSFOTO VAN HET GEÏNSTALLEERDE SANERINGSSYSTEEM (LAADKAAI) 106
FIGUUR 20. PEILBUISLOCATIES EN VERONTREINIGINGSSITUATIE GRONDWATER TEN TIJDE VAN HET BBO (TEKENING OVERGENOMEN UIT BSP) 107
FIGUUR 21. SAMENSTELLING NAAR STOFGROEPEN VAN DE OLIE. TEVENS ZIJN DE DEELFRACTIES AROMATEN EN ALIFATEN WEERGEGEVEN (DUPLO BEPALING). 110
FIGUUR 22. SANERINGSMATRIX VAN DE OLIE OP DE SANERINGSLOCATIE 112
FIGUUR 23. ANALYSE VAN DE EUBACTERIËLE MICROBIËLE POPULATIE IN DE BODEM ... 115
FIGUUR 24. ANALYSE VAN DE EUBACTERIËLE MICROBIËLE POPULATIE IN DE OORSPRONKELIJKE AQUIFER 116
FIGUUR 25. 121

Lijst met afkortingen

ATP	adenosine trifosfaat
AVS	zure vluchtige sulfide
BBO	beschrijvend bodemonderzoek
BBT	best beschikbare techniek
BLE	bodemluchtextractie
BOD	biologische zuurstof vraag
BSP	bodemsaneringsproject
BTEX	benzeen, tolueen, ethylbenzeen en xyleen (monoaromatische koolwaterstoffen)
CFU	kolonievormende eenheden
CGP	code van goede praktijk
DGGE	differential gel electrophoresis
DIC	opgeloste anorganische koolstof
DNA	desoxyribonucleïnezuur
DOC	opgeloste organische koolstof
EBDS	erkende bodemsaneringsdeskundige
EC	electrische conductiviteit
Eh	redoxpotentiaal
ETBE	ethyl tertair butylether
FID	Vlam ionisatie detector
GC	gaschromatografie
K	hydraulische conductiviteit
K_{ow}	octanol waterverdelingscoëfficient
LNAPL	Light non aquaeous phase liquid
MS	massa spectrometrie
MTBE	metyl tertair butylether
NAPL	non aquaeous phase liquid

NSO	stikstof, zwavel, zuurstof
OK	olie karakterisatie
ORP	zuurstof reductie poteniaal
OS	organische stof
OVAM	Openbare Afvalstoffenmaatschappij voor het Vlaamse Gewest
PAK	polyaromatische koolwaterstoffen
PCR	polymerase chain reaction (identificatie specieke bacteriën)
PER	tetrachloorethyleen
pH	zuurtegraad
PID	foto ionisatie detector
PLC	programeerbare logische controlers
PLI	persluchtinjectie
RNA	ribonucleïnezuur
TBA	tertiair buytylalcohol
TMB	trimethylbenzeen
TPH	totaal pertoleum koolwaterstof
VLAREM	Vlaams Regement voor Milieuvergunningen
VOCl	vluchtige organische chloorwaterstoffen

Samenvatting

Petroleumkoolwaterstoffen zijn veelvuldig in het milieu terecht gekomen door hun wijdverspreid gebruik o.a. als brandstof, oplos- en smeermiddel. Dit kan onder andere gebeurd zijn als gevolg van lekken in leidingen en opslagtanks, overslagactiviteiten en accidentele lozingen.

Petroleumkoolwaterstoffen kunnen in de bodem worden afgebroken door micro-organismen. Hoofdstuk 2 behandelt een aantal algemene aspecten betreffende deze biologische afbraak. De achterliggende processen komen tevens aan bod in de Code van goede praktijk – Natuurlijke attenuatie, beschikbaar op de OVAM website: www.ovam.be. Laatstgenoemd rapport betreft de van nature optredende afbraak – zonder menselijk ingrijpen in het afbraakproces. Het huidige rapport richt zich op de verschillende beschikbare methoden voor het *stimuleren* van natuurlijke afbraak, hetgeen bioremediatie wordt genoemd.

In hoofdstuk 3 worden de verschillende methoden voor in-situ bioremediëring globaal besproken. Bij deze saneringstechnieken wordt de biologische afbraak van verontreinigingen in de ondergrond, zonder voorafgaandelijke uitgraving, gestimuleerd. In het algemeen worden de autochtone micro-organismen gestimuleerd door het inbrengen van zuurstof (eventueel onder de vorm van waterstofperoxide of nitraat) en/of nutriënten. Samen hiermee kunnen reagentia worden ingebracht die de oplosbaarheid verhogen. Voor het opstarten of versnellen van het proces wordt soms gebruik gemaakt van vooraf geconditioneerde micro-organismen (bioaugmentatie/inoculatie). Deze laatste zijn commercieel beschikbaar maar hun doeltreffendheid in het veld is niet altijd bewezen. De verschillende technieken die worden toegepast bij de bioremediatie van met petroleum verontreinigde gronden worden besproken, waaronder: infiltratie, bioventing, biosparging, bioslurping, bioaugmentatie, reactieve wanden of zones en fytoremediatie.

Hoofdstuk 4 geeft de OVAM richtlijnen weer voor acceptatie van bioremediatie als voorkeursvariant in bodemsaneringsprojecten. In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de verschillende mogelijkheden voor voorafgaandelijk haalbaarheidsonderzoek dat kan dienen als onderbouwing van de (haalbaarheid van de) geselecteerde bioremediatievariant.

In hoofdstuk 5 wordt uiteengezet welke monitoringsactiviteiten dienen te worden uitgevoerd wanneer men beroep doet op bioremediatie als bodemsaneringstechniek. Hierbij wordt vooral aandacht besteed aan:

- milieuparameters die de afbraakprocessen beïnvloeden
- bodemkwaliteitsparameters
- indicatieve parameters voor biodegradatie
- kwantitatieve parameters voor biodegradatie
- operationele procesparameters.

Ten slotte worden in appendix twee bioremediatiecases besproken.

1 Inleiding

1.1 Petroleumkoolwaterstoffen in het milieu

Petroleumkoolwaterstoffen zijn veelvuldig in het milieu terecht gekomen door hun wijdverspreid gebruik als brandstof, oplos- en smeermiddel. Dit kan onder andere gebeurd zijn als gevolg van lekken in leidingen en opslagtanks, overslagactiviteiten, accidentele lozingen en gebruik in brandweeroefeningen.

In geval van een lozing van petroleumkoolwaterstoffen in de bodem, zal het product zich verspreiden over de verschillende bodemcompartimenten: de luchtfase (poriën), waterfase (poriën) en vaste fase (bodemmatrix). Uiteindelijk zal het product voorkomen als:

- geadsorbeerde fractie aan de bodempartikels (minerale oppervlakken en organische stof) in de onverzadigde of verzadigde zone;
- in de gasfase in de wateronverzadigde bodemdeel;
- als vrij (mobiel) product (LNAPL) op de grondwatertafel of als immobiel puur product, door capillaire krachten gevangen in bodemporiën (residueel product) in de onverzadigde of verzadigde zone;
- opgelost in het grondwater of in het poriënwater.

1.2 Eigenschappen van petroleumkoolwaterstoffen

1.2.1 Chemische samenstelling

Ruwe olie is een organisch materiaal van natuurlijke oorsprong dat bestaat uit koolwaterstoffen met koolstofketenlengtes van C_2 tot C_{60} en producten die stikstof, zwavel of zuurstof bevatten (NSO verbindingen). Verder komen er ook enkele zware metalen in voor. Ruwe olie is het resultaat van hoge druk en temperatuursacties op biologisch materiaal op een geologische tijdsschaal. Ten gevolge van de variabiliteit van deze factoren is de samenstelling van ruwe olie afkomstig van verschillende plaatsen dan ook zeer variabel.

Ruwe olie bevat meer dan honderdduizend chemische verbindingen; het destillaat benzine alleen bevat reeds meer dan 500 verschillende verbindingen (Matisova et al., 1985). Deze complexiteit neemt nog toe onder invloed van biodegradatie in de bodem, waarbij allerlei oxidatieproducten worden gevormd (alcoholen, aldehyden, organische zuren,…).

Men kan petroleumkoolwaterstoffen onderverdelen in volgende categorieën (Bundt, 1995):

Alifatische koolwaterstoffen (45-85 % in ruwe olie). Hieronder vallen de *n-alkanen* (parafines), *iso-alkanen* (b.v. isopreenachtigen zoals fytaan en pristaan), *cycloalkanen/naftenen* (gealkyleerde cyclopentanen en – hexanen, cyclische isopreenverbindingen zoals steranen en hopanen), de *onverzadigde koolwaterstoffen* (alkenen of olefines en de alkynen). Deze laatste komen bijna niet voor in ruwe olie, maar wel in raffinageproducten. De cyclo-alifatische producten (naftenen) in ruwe olie bestaan bijna volledig uit cyclopentaan en cyclohexaan ringen met of zonder alkylsubstituenten en ook voorkomend in multiringstructuren.

Aromatische koolwaterstoffen (5-20 % in ruwe olie). Deze bestaan hoofdzakelijk uit al dan niet gealkyleerde (vooral gemethyleerde) 1 tot 6-ring aromaten en de nafteenaromaten (zoals gealkyleerde indanen en tetralinen).

Polaire restfractie (2-15 % in ruwe olie), bestaande uit de *heterocyclische verbindingen* (S-, N- of O-houdend, zoals furanen, thiofenen, carbazolen), polaire koolwaterstoffen (zoals alcoholen, fenolen en carbonzuren) en asfaltenen.

De **zuurstof bevattende producten** zijn meestal organische zuren, maar fenol, isomeren van cresol en xylenol komen ook voor. Daarnaast komen zwavelverbindingen voor (o.a. als thiolen). Stikstofverbindingen komen vrij weinig voor.

Asfaltenen tenslotte zijn componenten met een hoog moleculair gewicht die meestal gebonden zijn aan NSO-eenheden.

De PAK-profielen van minerale olie zijn sterk verschillend van deze die ontstaan ten gevolge van onvolledige verbranding van organische stoffen. De laatste groep is gekenmerkt door mogelijke vorming van honderden verschillende PAK-structuren. In minerale olie treft men een zeer complex isomerenmengsel aan van alkylgesubstitueerde PAK's met een beperkt aantal basisstructuren.

1.2.2 Olieproducten

Petroleum koolwaterstoffen zijn vervaardigd op basis van de distillatie van aardolie (ruwe olie), waarbij een aantal commerciële producten worden bekomen die in eerste instantie kunnen worden onderscheiden door hun kookpuntbereik, viscositeit en dichtheid. De belangrijkste olieproducten worden samengevat in tabel 1 (naar P. Doelman & G. Schraa, 1995).

Tabel 1. Eigenschappen van de belangrijkste olieproducten

Olietype	C-fracties	Aromaten Totaal %	BTEX %	Kooktracject (Ć)
LPG	C2 – C5	0	0	-42 – 0
Benzine	C4 – C10	40	25	25 – 200
Nafta	C5 – C10	10-40	0-5	40 – 200
Petroleum	C7 – C15	20	< 1	140 – 270
Jet Fuel A	C7 – C15	20	-	140 – 270
Jet Fuel B	C5 – C15	25	-	50 – 270
Dieselolie	C8 – C20	20	-	170 – 360
Huisbrandolie	C9 – C24	20	-	180 – 370
Stookolie	C20 – C40	65	-	300+
Smeerolie	C20 – C40	0-60	-	300+

De koolwaterstoffen in ***benzine*** hebben een koolstofketenlengte die grotendeels gelegen is tussen C5 en C12. ***Nafta*** heeft een gelijkaardige samenstelling als benzine voor wat betreft de n-alkanen. Benzine bevat echter olefines (alkenen en alkynen) die afwezig zijn in nafta. Benzine bevat ook een aantal additieven voor de verhoging van het octaangetal, waaronder iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan), tolueen, ethylbenzeen, xylenen en trimethylbenzeen. Verder kunnen ***oxygenaten*** toegevoegd worden aan benzine, zoals *MTBE* (methyl tertiair-butylether), *ETBE* (ethyl-TBE) en *TBA* (tertiair-butylalcohol) (zie verder).

Keroseen of kerosine heeft een alkanensamenstelling tussen C7 en C15, met zwaartepunt rond C11-C13. Militaire keroseen heeft een iets lichtere samenstelling dan deze voor commerciële luchtvaart, met relatief meer aromaten.

Dieselolie en huisbrandolie hebben een zeer gelijkaardige samenstelling, met n-alkanen tussen C8 en C20, resp. C9-C24, waarbij het zwaartepunt ligt tussen C13 en C17. De vertakte en cyclische alkanen gaan tot 60 à 90 % in volume. Aromatische producten (b.v. alkylbenzeen) en alkenen zijn aanwezig voor 5-40% en 0-10% respectievelijk. PAKs kunnen voorkomen tot 1 g/l. Verder zijn 2 typische isopreenalkanen aanwezig, n.l. *pristaan* (2,6,10,14-tetramethylpentadecaan) en *phytaan* (2,6,10,14-tetramethylhexadecaan). Diesel heeft een dichtheid tussen 0,8 en 0,95 g/ml). De dampspanning ligt tussen de 2,8 en 35 kPa. De Henry constante is 6-7 10^5 Pa m³/mol. De log K_{ow} is 3,3-7,0 en de log K_{oc} is 3,0 – 6,7.

Stookolie bestaat in verschillende kwaliteiten, met koolstofketenlengten tussen C19 en C40, met een zwaartepunt tussen C19 en C25. De zware stookolie (bunkerolie) is zeer visceus en heeft een dichtheid groter dan water zodat deze zaklagen kan vormen in de ondergrond.

Smeeroliën, waaronder transmissie-oliën en hydraulische oliën, hebben een koolwaterstofsamenstelling die vooral is gelegen tussen C20 en C40. Zij bevatten zeer weinig n-alkanen omdat die meestal worden verwijderd bij de productie van deze oliën (anders zou de olie stollen bij kamertemperatuur). Smeeroliën zijn rijk aan vertakte alkanen en cycloalkanen.

MTBE $(CH)_3C(OCH_3)$ is een synthetisch product dat in de VS aan benzine toegevoegd wordt sinds 1979 en in Europa sinds 1988. Het wordt gebruikt om de verbranding van benzine te optimaliseren en te vermijden dat koolstofmonoxide of andere onvolledige verbrandingsproducten gevormd worden. Omwille van deze oxygenerende effecten werd MTBE gebruikt als vervanger van Pb (tetra-ethyllood) om de strengere luchtemissienormen te halen. Andere producten die daarvoor gebruikt worden zijn ethanol, methanol en ETBE en TBA, zoals eerder vermeld. De concentraties die gebruikt worden liggen tussen 1,5 en 15% (2,7% zuurstof in de benzine). MTBE is zeer goed oplosbaar in het grondwater, sorbeert zeer slecht aan de bodemmatrix, en wordt slecht afgebroken (biologische afbraak is slechts mogelijk onder specifieke omstandigheden). De belangrijkste bron van vervuiling zijn lekkende (ondergrondse) benzinetanks. MTBE wordt door de US-EPA beschouwd als een mogelijk carcinogeen product. Het heeft een zeer lage geur-en smaakdrempel voor drinkwater (20-40µg/l).

1.2.3 Fysische eigenschappen en gedrag in het milieu

Als petroleumkoolwaterstoffen in de bodem komen, worden ze omringd met een geheel van sterk gestructureerde watermoleculen uit de waterfase. Ten gevolge hiervan worden de niet-polaire delen uit de waterfase gestoten. De vrije energie, bekomen door deze expulsie, leidt tot de sorptie van de verbindingen aan organisch materiaal in de bodem. Al bij concentraties van enkele honderden mg/kg komen de koolwaterstoffen voor als afzonderlijke fase (NAPL: non-aqueous-phase-liquid).

Wanneer olieproducten in de onverzadigde zone van de bodem terecht komen dan kan de bodem een maximale hoeveelheid olie weerhouden in het poriënvolume die ondermeer afhankelijk is van de aard van de bodem. Dit wordt de (olie)retentiecapaciteit genoemd (tabel 2). De NAPL is mobiel in de bodem bij

(locale) overschrijding van deze retentiecapaciteit van de bodem; in dit geval kan de NAPL uitzakken tot op grondwaterniveau en daar een drijflaag vormen.

Tabel 2. Indicatief opnamevermogen (retentiecapaciteit, in mg/kg) van bodems voor brandstofproducten (Nobis, 1997)

Type	Grind	Grof zand	Middelfijn zand	Fijn zand
Benzine	1000	1600	3200	5000
Diesel	2000	3200	6400	10000
stookolie	4000	6400	12800	20000

Verder zullen tegelijk verdamping, uitloging en biologische afbraak optreden. Door deze processen zal de samenstelling van de achterblijvende olie veranderen (verwering) en zal de totale concentratie in de bodem afnemen. De concentratie in de waterfase kan (tijdelijk) toenemen doordat tijdens de afbraak en verwering, meer polaire verbindingen worden gevormd (oxidatieproducten). De stoffen die uitlogen komen terecht in het grondwater en worden meegevoerd met het grondwater (advectie). Door verdunning, differentiële sorptie en biodegradatie zal tevens de samenstelling van de in het grondwater opgeloste fractie veranderen en zal de concentratie afnemen met de afstand tot de bron.

De snelheid van uitloging, verdamping en afbraak hangt af van een groot aantal factoren zoals:

- bodemopbouw
- terreinverharding
- grondwaterpeil
- schommelingen van de grondwatertafel
- grondwaterstromingssnelheid
- aard van de verontreiniging
- concentratie en de hoeveelheid verontreiniging
- biodegradatiecapaciteit van de bodem.

2 Biologische afbraak van petroleumkoolwaterstoffen

Dit hoofdstuk behandelt een aantal algemene aspecten betreffende de biologische afbraak van petroleumkoolwaterstoffen. De informatie die hierna wordt gegeven is eveneens grotendeels opgenomen in de Code van goede praktijk – Natuurlijke attenuatie beschikbaar op de OVAM website: www.ovam.be.

2.1 algemene aspecten

Vele micro-organismen, waaronder bacteriën en schimmels, zijn in staat om verontreinigingen te metaboliseren. Onder ideale omstandigheden worden deze volledig afgebroken tot onschadelijke stoffen zoals kooldioxide en water (aërobe afbraak) of methaan en kooldioxide (anaërobe afbraak). Gedurende het afbraakproces ontstaan metabolieten en nevenproducten die soms toxisch kunnen zijn. Een groot voordeel van een succesvolle biodegradatie is dat de bodem na reiniging biologisch gezond is en direct geschikt voor multifunctioneel hergebruik. Beperkingen zijn de relatief lange saneringsduur, de noodzaak voor uitgebreid vooronderzoek naar haalbaarheid en de mogelijke vorming van toxische metabolieten.

Een succesvolle biologische behandeling van petroleumkoolwaterstoffen vereist een optimalisering van de volgende factoren:

- pH-waarden ca. neutraal;
- een optimale toevoer van zuurstof (of een alternatieve elektronacceptor)
- voldoende vochtigheidsgraad;
- optimale werkingstemperatuur;
- afwezigheid van inhibitoren (toxische stoffen zoals b.v. zware metalen of een te hoog zoutgehalte) voor microbiële groei;
- optimale nutriëntverhoudingen voor de micro-organismen;
- aanwezigheid van aan de vervuiling geadapteerde micro-organismen (eventueel te introduceren: bioaugmentatie).

Factoren die al dan niet een praktische toepassing beïnvloeden zijn:

- afbreekbaarheid van de verontreiniging;
- oplosbaarheid/biobeschikbaarheid van de verontreiniging;
- seizoensgebonden temperatuurfluctuaties;
- residuele concentraties die na de behandeling achterblijven;
- potentiële vorming van oplosbare toxische metabolieten.

2.1.1 Micro-organismen: bacteriën en schimmels

In elke bodem is een populatie micro-organismen aanwezig. Deze (endogene) populatie past zich continu aan aan de heersende milieuomstandigheden in de bodem, zoals nutriëntengehalte, pH, temperatuur, vochtgehalte, redoxtoestand, etc.. Door het optimaliseren van de omstandigheden kan men de aanwezige populatie beïnvloeden en aanpassen om de afbraak van koolwaterstoffen te versnellen. Het toevoegen van (gekweekte) specifieke micro-organismen is veelal niet effectief, want deze specifieke exogene micro-organismen zullen worden beconcurreerd door de endogene organismen. Omdat de toegevoegde

organismen alleen zijn aangepast aan de verontreiniging en (doorgaans) niet aan de overige heersende milieuomstandigheden, kunnen ze soms moeilijk overleven in het bodemmilieu waaraan ze worden toegevoegd.

2.1.2 Nutriënten

Voor de productie van biomassa is de toevoer van voldoende nutriënten essentieel. De elementen stikstof, fosfor en zwavel (N, P, S) moeten in voldoende mate aanwezig zijn. Een veel gebruikte formule voor biomassa is $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}S_{0.0046}P_{0.0054}$. In de praktijk kunnen zowel N als P en soms K worden toegevoegd om een optimaal milieu voor biologische afbraak te verkrijgen. In vele gevallen is dit echter niet nodig omdat deze stoffen reeds in voldoende mate in de bodem of in de verontreiniging voorhanden zijn. Bij overdosering van nutriënten zal de microbiële afbraak soms geremd worden.

2.1.3 Vochtgehalte

Biologische afbraak vindt alleen plaats in aanwezigheid van water. Wanneer het vochtgehalte echter hoog is, zal een groot deel van de poriën met water gevuld zijn, waardoor transport van zuurstof een beperkende factor voor de biologische afbraak kan worden (dit geldt wanneer de verontreinigingen ook in de poriën aanwezig zijn). Voor landfarmingsystemen worden vochtgehaltes van 10 - 20% toegepast (of 50-60 % van het maximaal wateropnamevermogen).

2.1.4 Concentraties, toxiciteit

Verschillende verontreinigende stoffen zijn toxisch voor micro-organismen. De toxiciteit hangt in bepaalde mate samen met de octanol-waterverdelingscoëfficiënt (K_{ow} of P_{ow}). Deze waarde geeft de verdeling van een stof over een organische fractie (octanol) en water en is een maat voor de hydrofobiciteit van de verbinding (hoe hoger de waarde hoe hydrofober). Voor de meeste petroleumkoolwaterstoffen is deze waarde hoog tot zeer hoog. In het algemeen geldt dat organische verontreinigingen met een log $K_{ow} > 4$ niet remmend zijn voor de microbiologische afbraak, en organische oplosmiddelen met een log $K_{ow} < 2$ toxisch kunnen zijn. Een hoge K_{ow} kan echter leiden tot sterke sorptie aan de (organische) bodemmatrix en bijgevolg een lage biobeschikbaarheid (zie verder).

De toxiciteit is afhankelijk van de concentratie van de verontreiniging. Boven een bepaalde drempelconcentratie kan de microbiële afbraak worden geremd en bij toenemende concentraties kan deze helemaal stilvallen. De drempelconcentraties kunnen op hun beurt afhankelijk zijn van de milieuomstandigheden, de graad van adaptatie van de micro-organismen en de aanwezigheid van nevenverontreinigingen.

2.1.5 Zuurtegraad

De pH van de grond moet tussen 5 - 8 liggen om optimaal te zijn voor de meeste koolwaterstof afbrekende micro-organismen. Bij aërobe afbraak van minerale olie treedt een *verzuring* op van de bodem door de vorming van koolzuur of intermediaire organische zuren. Het zuurbufferend vermogen van de grond dient voldoende hoog te zijn om deze verzuring te minimaliseren.

2.1.6 Biobeschikbaarheid

De afbraak van organische verbindingen vindt bijna uitsluitend plaats in de waterfase, dus wanneer de verontreinigende stoffen eerst zijn opgelost in het bodemvocht waarmee de micro-organismen zijn omgeven. Voor verontreinigende stoffen die (1) als vaste deeltjes voorkomen (b.v. kooldeeltjes), (2) een lage wateroplosbaarheid hebben, (3) sterk geadsorbeerd zijn aan de bodemmatrix of (4) via diffusie terecht zijn gekomen in de microporiën van de bodemdeeltjes, geldt dat de afbraaksnelheid sterk wordt beïnvloed door de snelheid waarmee de verontreinigende stoffen de afbrekende organismen kunnen bereiken. Vaak zullen oliecomponenten aanwezig in grond langzaam in oplossing gaan, waardoor de biobeschikbaarheid ervan klein is. In die gevallen zal het reinigingsproces (zeer) langdurig zijn.

Enkel de wateroplosbare fractie van de verontreiniging wordt beschouwd als de biologisch afbreekbare fractie omdat enkel deze fractie biobeschikbaar is. Het stoftransport, de stofovergang en de stofopname zijn beperkende factoren. De lengte van de koolwaterstofketen of het molecuulgewicht is daarom bepalend voor de snelheid van afbraak. Met toenemende molecuulmassa stijgt de hydrofobiciteit, waardoor de wateroplosbaarheid en de biobeschikbaarheid afnemen.

Volgens sommige onderzoekers kunnen lage eindconcentraties (in de orde van grootte van µg/L) van koolwaterstoffen in gereinigde grond niet worden behaald omdat micro-organismen bij omzetting van lage substraatconcentraties onvoldoende energie kunnen vrijmaken voor de vastlegging van koolstof. Er zou te weinig energie vrijkomen voor het celonderhoud van de micro-organismen. Er kan ook een minimale concentratie nodig zijn om een inductie te verkrijgen van de microbiële activiteit. Deze lage eindconcentraties worden ook drempelconcentraties genoemd.

2.2 Biodegradatie onder aërobe omstandigheden

Bij de volledige aërobe afbraak van minerale olie wordt behalve CO_2 en H_2O ook biomassa gevormd volgens de volgende vergelijking:

$$\mathbf{CH_{1.8} + a\ O_2 + e\ NH_3 \rightarrow b\ CO_2 + c\ CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + d\ H_2O}$$

De meeste petroleumkoolwaterstoffen zijn in principe biologisch afbreekbaar, maar de snelheid en de omzettingsgraad kunnen sterk uiteenlopend zijn. Deze worden bepaald door een aantal factoren, waaronder:

- de hoeveelheid en de kwaliteit van biobeschikbare elektronacceptoren en nutriënten,
- de soorten en hoeveelheden micro-organismen,
- de hoeveelheden en de samenstelling van de koolwaterstoffen.

Zowel bacteriën als schimmels en actinomyceten kunnen minerale olie afbreken. Van de totale bodemmicroflora is 1 - 5 % potentieel in staat om olie af te breken. Omwille van de complexiciteit van de meeste olieproducten zijn meerdere enzymen vereist voor de afbraak ervan. Voor een goede afbraak is daarom een consortium van micro-organismen vereist (Jamison et al, 1975; Ridgeway et al, 1990).

De wateroplosbare fractie wordt beschouwd als de biologisch afbreekbare fractie omdat deze biobeschikbaar is. Het stoftransport (vaste fase → waterige fase), de stofovergang (waterige fase → micro-organisme) en de stofopname en -omzetting (transport doorheen celmembaan; de omzetting ervan intracellulair) zijn beperkende factoren.

De lengte van de keten of het molecuulgewicht is daarom bepalend voor de snelheid van afbraak. Met toenemende molecuulmassa stijgt de hydrofobiciteit, waardoor de wateroplosbaarheid en de biobeschikbaarheid afnemen. De volgende volgorde van relatieve biodegradeerbaarheid van alifatische koolwaterstoffen werd gerapporteerd (Perry and Cernigli, 1973, volgens afnemende afbreekbaarheid):

n-alkanen (C10-C19)
Gassen (C2-C4)
n-alkanen (C5-C9)
Vertakte alkanen tot C12
Alkenen (C3-C11)
Vertakte alkenen
cycloalkanen

2.2.1 n-Alkanen

n-Alkanen worden in principe relatief vlot geoxideerd via de ß-oxidatieketen, een elementair bestanddeel van de heterotrofe stofwisseling. Deze met ketenlengten C_{10}-C_{25} worden het gemakkelijkst geoxideerd, hoewel biodegradatie van n-alkanen met ketenlengtes tot C_{44} is aangetoond. Hoogmoleculaire alkanen, die als wassen in vaste vorm voorkomen, zijn in principe niet biobeschikbaar. Voor de inkorting van lange ketens of van kortere ketens kunnen verschillende micro-organismen verantwoordelijk zijn.

n-Alkanen met 5 tot 9 koolstofatomen (benzines) zijn biologisch afbreekbaar maar hebben bij hoge concentraties een bactericide werking (membraantoxisch) en zijn daarom bij verhoogde concentraties door slechts enkele gespecialiseerde stammen afbreekbaar. Onder deze omstandigheden verdwijnt deze fractie uit de bodem vooral door strip- en oplossingseffecten.

De afbraak van n-alkanen verloopt via andere mechanismen dan deze voor isoalkanen en cycloalkanen. Men onderscheidt terminale oxidatie, alfa-oxidatie en diterminale oxidatie. Bij terminale oxidatie gebeurt de initiële oxidatiestap aan één van de beide uiteinden van de koolstofketen. Hierbij wordt door een monoöxygenase enzyme eerst een vrij radicaal en vervolgens een alcohol gevormd, dat verder wordt geoxideerd tot een aldehyde of carbonzuur. Door ß-oxidatie van het carbonzuur worden vetzuren en acetyl-coënzyme A gevormd, met uiteindelijke vrijstelling van kooldioxide. Vetzuren kunnen toxisch zijn en kunnen accumuleren gedurende het biodegradatieproces. Bij alfa-oxidatie van alkanen gebeurt de eerste oxidatiestap ook aan het uiteinde van de koolstofketen, maar aan het alfa-atoom, waardoor een alfa-alcohol wordt gevormd dat verder wordt geoxideerd tot een methylketon.

2.2.2 Vertakte alkanen en cycloalkanen

De afbreekbaarheid neemt ook af naarmate de koolstofketens meer vertakt zijn (isoprenoïden). Aan het vertakkingspunt kan immers geen ß-oxidatie optreden. Vooral wanneer de vertakking sterk is uitgesproken of wanneer er quaternaire koolstofatomen of terminale vertakkingen aanwezig zijn is de afbreekbaarheid gering.

2.2.3 Cycloalkanen

Deze zijn het moeilijkst af te breken en zijn meestal toxisch voor de bacteriën. Alkylgesubstitueerde cycloalkanen zijn nog moeilijker afbreekbaar dan niet gesubstitueerde cycloalkanen. Complexe alicyclische verbindingen zoals hopanen zijn de meest recalcitrante stoffen bij olieverontreiniging. Degradatie van cycloalkanen kan in beperkte mate voorkomen door co-oxidatie tot een cyclo-alkanon dat verder wordt afgebroken door commensalisme.

2.2.4 Alkenen

Alkenen worden minder vlot afgebroken dan de overeenkomstige n- of isoalkanen. Dit is te wijten aan de vorming van epoxiden die een toxische invloed hebben op de bacteriën. Onverzadigde 1-alkenen worden meestal geoxideerd aan de verzadigde zijde van de molecule volgens dezelfde mechanismen als alkanen. Zij zijn slechts degradeerbaar voor ketenlengtes vanaf C12. 2-alkenen zijn beter afbreekbaar dan 1-alkenen. Sommige micro-organismen kunnen alkenen omzetten in alkaan-1,2-diolen. Ook de vorming van epoxiden is mogelijk, die verder kunnen omgezet worden in carbonzuren.

Ten gevolge van de verschillen in afbraaksnelheid zal gedurende het biodegradatieproces een relatieve aanrijking plaatsvinden van stoffen met een grotere molecuulmassa. Hierbij kunnen alkanen met zeer lange ketens (wassen) en esters domineren die zeer weerstandig zijn aan verdere enzymatische afbraak.

2.2.5 Monoaromatische koolwaterstoffen (BTEX)

In Tabel 3 worden de zes BTEX moleculen en enkele relevante eigenschappen ervan weergegeven. Voor de biodegradatie van BTEX in de bodem is er een aanwezigheid nodig van een geschikte en voldoende grote microbiële populatie die in staat is BTEX-componenten af te breken. Een kritisch aantal BTEX-afbrekende organismen moet immers aanwezig zijn om afbraak te induceren.

De polluentconcentratie kan een beperkende factor zijn voor de afbraaksnelheid:
- te hoog: mogelijk toxisch (b.v. in drijflagen met BTEX)
- te laag: weinig biobeschikbaar (vooral in bodems met een hoog organische stofgehalte)
- aanwezigheid van inhiberende factoren.

Sommige stoffen kunnen de afbraak stimuleren:
- fulvuszuren helpen de stimulatie van tolueen-afbraak enzymes
- aromatische componenten zoals benzoaat, phenylalanine zorgen voor een preferentiële selectie voor BTEX-afbrekers.

Algemeen kan gesteld worden dat de meeste BTEX-componenten aanwezig in de gas-, water- en bodemfase, relatief goed aëroob en anaëroob biologisch afbreekbaar zijn. De afbraak verloop echter steeds via de waterfase (opgeloste BTEX). Daarom zijn BTEX-componenten aanwezig als een aparte vloeistoffase (NAPLs) niet rechtstreeks biologisch afbreekbaar. Daarnaast gaan in dat geval ook toxische effecten een belangrijke rol spelen (te hoge concentraties).

De microbiologische afbraak van aromatische polluenten zoals BTEX en PAKs verloopt via de volgende 5 stappen:

1. Opname in de cel van de polluent en eventueel inductie van specifieke catabolische enzymes.
2. Transformatie/metabolisatie van de zijketens (hydroxylatie, demethylatie, decarboxylatie) als voorbereidende stappen op ringsplitsing
3. Ringsplitsing
4. Vorming van centrale metabolische componenten
5. Verdere degradatie van deze componenten via centrale afbraakwegen.

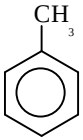
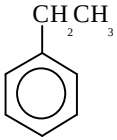
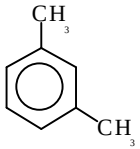
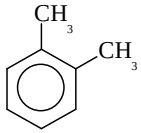
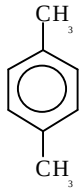
In **Tabel 4** zijn een aantal bacterie- en schimmelsoorten weergegeven die BTEX-componenten kunnen (co)metaboliseren.

Zuurstof is hierbij noodzakelijk en heeft een dubbele functie: (1) als elektronen-acceptor en (2) als co-substraat dat ingebouwd wordt in de polluent. Onderstaande reactie (Figuur 1) geeft weer hoe zuurstofmoleculen worden ingebouwd tot vorming van achtereenvolgens een catechol, dat een centraal metaboliet is in veel BTEX-afbraakwegen, en ringsplitsingsprodukten (organische zuren).

Aërobe afbraak van BTEX geeft dus aanleiding tot de vorming van fenolen als tussenproducten. Deze worden op hun beurt verder gemetaboliseerd. Door het meten van een groepsparameter als de fenolindex of van specifieke fenolen kan men daarom kwalitatief afbraak van BTEX aantonen.

De biodegradatiesnelheid van BTEX ligt lager dan deze van n-alkanen, maar hoger dan deze van cycloalkanen.

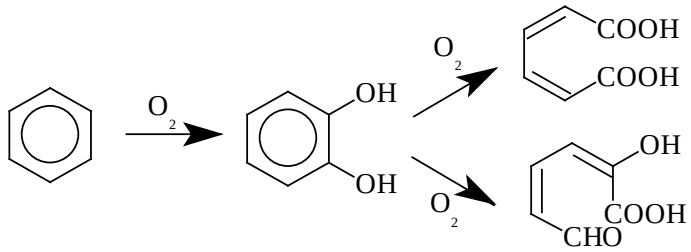
Tabel 3. Algemene eigenschappen van de 6 BTEX-aromaten.

BTEX-component	**Benzeen**	**Tolueen**	**Ethylbenzeen**	***m*-Xyleen**	***o*-Xyleen**	***p*-Xyleen**
Formule	C_6H_6	C_7H_8 	C_8H_{10} 	C_8H_{10} 	C_8H_{10} 	C_8H_{10} 
MW (g/mol)	78.12	92.15	106.17	106.17	106.17	106.17
Dichtheid	0.8787	0.8669	0.87	0.86	0.88	0.86
Kookpunt (℃)	80.1	110.6	136	139	144	138.4
Wateroplosbaarheid 15-16 ℃ 20 ℃ 25 ℃	 1.780 g/l	 470 mg/l 515 mg/l	 140 mg/l 152 mg/l	 180 mg/l 162 mg/l	 175 mg/l	 198 mg/l
Dampspanning (mm Hg) 15 ℃ 20 ℃ 30 ℃	 60 76	 22 (40)	 7 12	 6 11	 5 9	 6.5 12
Henri coëfficiënt	0.22	0.26	0.32			
K_{oc} (L/kg)	79	190	468	422	405	357
Biodegradeerbaarheid	Matig tot goed	Zeer goed	Zeer goed	Zeer goed	Goed	Zeer goed

Tabel 4. Overzicht van enkele bacterie- en schimmelsoorten die BTEX-componenten aëroob kunnen metaboliseren (Riser-Robert, 1998)

BTEX	Micro-organisme	Soort
B	Bacteriën	*Pseudomonas rhodochrous; Pseudomonas aeruginosa; Pseudomonas putida*
	Schimmels	*Phanerochaete chrysosporium*
T	Bacteriën	*Pseudomonas aeruginosa; Pseudomonas putida; Pseudomonas mendocina; Pseudomonas sp.; Achromobacter sp.; Bulkholderia cepacia; Bulkholderia pickettii*
	Schimmels	*Phanerochaete chrysosporium*
E	Bacteriën	*Pseudomonas putida; Pseudomonas sp.*
	Schimmels	*Phanerochaete chrysosporium*
m-X	Bacteriën	*Pseudomonas putida; Nocardia sp.; Sphingomonas yanoikuyae;*
	Schimmels	*Phanerochaete chrysosporium*
o-X	Bacteriën	*Pseudomonas sp.; Nocardia sp.; Burkholderia cepacia*
	Schimmels	*Phanerochaete chrysosporium*
p-X	Bacteriën	*Pseudomonas putida; Nocardia sp.*
	Schimmels	*Phanerochaete chrysosporium*

Catechol



Figuur 1: Incorporatie van zuurstof tijdens aërobe afbraak van benzeen.

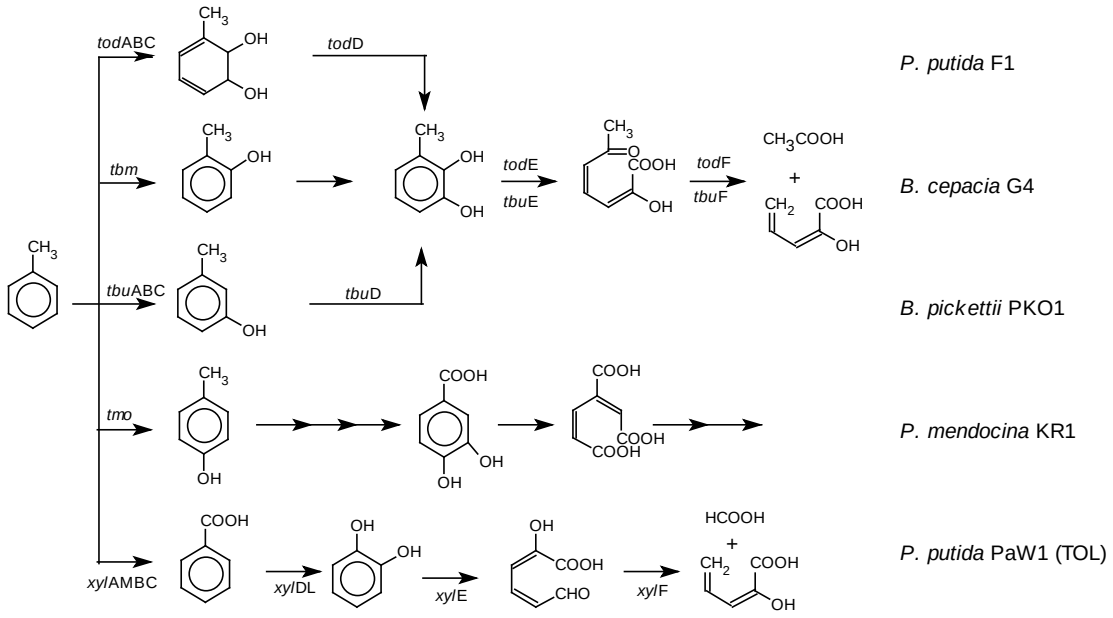
Benzeen
Benzeen is de meest aan afbraak weerstandige BTEX-component en slechts 0,5% van de bodem micro-organismen kan benzeen gebruiken als enige koolstofbron. Onder aërobe omstandigheden wordt benzeen door inwerken van o.a. mono- of dioxygenases achtereenvolgens omgevormd tot catechol en ringsplitsingproducten. Via ortho-splitsing van de aromatische ring wordt cis,cis-muconaat gevormd dat verder afgebroken wordt tot succinaat en acetaat, twee onschuldige centrale metabolieten. Verdere degradatie van 2-hydroxymuconaat semialdehyde, het meta-splitsingsprodukt, levert acetaldehyde en pyruvaat op als centrale metabolieten. Al deze centrale metabolieten kunnen gemakkelijk verder afgebroken worden via centrale afbraakwegen.

Tolueen
Voor de initiële oxidatie van tolueen door bacteriën zijn 5 verschillende mechanismen bekend, (Figuur 2):

1. Dihydroxylatie van de benzeenring

2.3.4. Monohydroxylatie van de benzeenring in de ortho, meta of para-positie.
5. Oxidatie van de methylgroep

Drie van deze 5 afbraakwegen verlopen via catechol, een ‘centraal’ metaboliet bij afbraak van aromatische componenten. Het eindprodukt van de 5 routes zijn onschuldige metabolieten die snel afgebroken kunnen worden.



Figuur 2: Aërobe afbraakwegen voor tolueen.

Ethylbenzeen
Voor ethylbenzeen zijn 3 verschillende afbraakwegen bekend.

1. Via initiële 2,3-dihydroxylatie van de benzeenring. Deze route loopt via een catechol-derivaat.
2. Via transformaties in de zijketen wordt styreen gevormd. Styreen zelf kan via twee verschillende wegen verder afgebroken worden:
   - Via mono-oxygenatie van de zijketen
   - Via dihydroxylatie van de benzeenring. Catachol-derivaat wordt hierbij gevormd.
3. Via oxidatie van de ethyl-zijketen (minder belangrijke dead-end route).

Xylenen
De drie xyleen isomeren kunnen alle aëroob worden afgebroken, maar de afbraaksnelheid van *o*-xyleen ligt beduidend lager dan deze van *m*- en *p*-xyleen. De afbraak gebeurt via initiële oxidatie van een van de methylgroepen. Telkens loopt de afbraakweg via catachol-derivaten.

2.3 Biodegradatie van petroleumkoolwaterstoffen in zuurstofloze omstandigheden

De meeste petroleumkoolwaterstoffen zijn het snelst biodegradeerbaar onder aërobe omstandigheden (Borden et al., 1995). In de meeste gevallen beperkt het zuurstofgehalte echter de snelheid van aërobe biodegradatie.

Voor de eerste afbraakstap van koolwaterstoffen is moleculaire zuurstof nodig. Na de eerste oxidatiestap kan wellicht nitraat fungeren als elektronacceptor, zodat anaërobe afbraak van tussenproducten ook mogelijk is. Anaërobe bacteriën vertegenwoordigen 10 - 15 % van de microbiële populatie in de bodem.

Sommige BTEX en alkanen kunnen in afwezigheid van zuurstof worden afgebroken en gemineraliseerd. De afbraaksnelheid is in dit geval veel kleiner dan onder aërobe omstandigheden.

2.3.1 Nitraatreducerende omzettingen

Wanneer zuurstof is opgebruikt (< 0,5 mg/l) en nitraat is beschikbaar dan zullen sommige micro-organismen nitraat gebruiken in plaats van zuurstof als terminale elektronacceptor. Onderzoek heeft aangetoond dat tolueen, ethylbenzeen, m-, p- en o-xyleen, naftaleen en een reeks andere koolwaterstoffen kunnen worden gemineraliseerd onder nitraatreducerende omstandigheden. Verschillende auteurs stellen dat benzeen niet afbreekbaar is onder nitraatreducerende omstandigheden, hoewel er toch sommige studies het tegendeel beweren (Alexander, 1999).

Wanneer de aanwezige zuurstof en nitraat zijn verbruikt dan kunnen de micro-organismen overgaan tot het gebruik van nog andere elektronacceptoren zoals mangaan (Mn(IV)), ferri-ijzer (Fe3+), sulfaat of kooldioxide.

2.3.2 IJzerreducerende omzettingen

Er zijn micro-organismen aangetoond die de reductie van ijzer(III) als elektronacceptor koppelen aan de oxidatie van aromatische verbindingen zoals tolueen, fenol, p-cresol en benzoaat. Driewaardig ijzer kan in vele aquifers in grote hoeveelheden aanwezig zijn en dus een belangrijke voorraad aan elektronacceptor leveren. De meeste verbindingen van driewaardig ijzer zijn echter onoplosbaar in water. Het is dan ook belangrijk dat dit ijzer biobeschikbaar is. Het kan voorkomen als kristallijne en amorfe vormen. De vormen die het gemakkelijkst worden gereduceerd zijn amorfe en weinig gekristalliseerde Fe(III) hydroxiden, Fe(III) oxyhydroxiden en Fe(III) oxiden (Lovley, 1991).

De reductie van driewaardig ijzer kan een significante verhoging veroorzaken van het gehalte tweewaardig ijzer in het grondwater, gekoppeld aan een afname van driewaardig ijzer in het aquifermateriaal. Sterk verhoogde gehalten aan ijzer in het grondwater (gemeten na 0,45 µm membraanfiltratie tijdens de bemonstering) in de pluimzone van de verontreinigingskern – t.o.v. het gehalte stroomopwaarts) wijst doorgaans op ijzer(III) gebruik als elektronacceptor. Er moet echter op gewezen worden dat verhoogde ijzergehaltes ook veroorzaakt kunnen zijn door andere bronnen (bvb. optreden van een lage redoxpotentiaal door de aanwezigheid van natuurlijk organisch materiaal; b.v. veenlagen, of de aanwezigheid van een riolering waaruit BOD-rijk water lekt).

2.3.3 Sulfaatreducerende en methanogene omzettingen

Het is experimenteel aangetoond dat een groot aantal verontreinigingen kunnen worden geoxideerd onder sulfaatreducerende of methanogene omstandigheden: o.m. cresol-isomeren, homocyclische aromaten zoals tolueen, o-xyleen, alkylbenzenen en onverzadigde koolwaterstoffen. Benzeen zou kunnen worden gemetaboliseerd onder sulfaatreducerende omstandigheden. Dit is van belang gezien vooralsnog wordt aangenomen dat benzeen recalcitrant is onder nitraatreducerende condities, terwijl het grondwater in vele aquifers aanzienlijke hoeveelheden sulfaat kan bevatten (Barbaro et al., 1992).

In Tabel 5 wordt een overzicht gegeven van de al dan niet bruikbare elektonacceptoren voor de anaërobe afbraak van BTEX.

Tabel 6 geeft een overzicht van micro-organismen die de capaciteit hebben om BTEX-componenten te transformeren/metaboliseren in afwezigheid van vrije zuurstof.

Het is bekend dat sulfaatreducerende en methanogene bacteriële gemeenschappen zeer gevoelig zijn voor een aantal milieuparameters, waaronder temperatuur, nutriënten, pH en toxische stoffen. De snelheid van afbraak kan onder deze omstandigheden sterk afnemen wanneer deze factoren ongunstig zijn.

Tabel 5. Anaërobe BTEX-afbreekbaarheid

BTEX\ e^-acceptor	**Nitraat**	**IJzer (III)**	**Sulfaat**	**CO_2**
Benzeen	?	+	+	+
Tolueen	+	+	+	+
Ethylbenzeen	-	?	?	?
m-xyleen	-	+	?	?
o-xyleen	-	+	+	+
p-xyleen	-	+	?	?

+: afbraak aangetoond;
?: onbekend (geen referenties) of tegenspraak in literatuur
-: geen afbraak aangetoond

Tabel 5 is opgemaakt op basis van literatuurgegevens weergegeven in tabel 5bis. Indien drie of meer referenties de afbraak van een bepaalde component onder bepaalde in situ omstandigheden bewijzen, werd dit met “+” in tabel 5 vermeld. Indien afbraak enkel in aanrijkingsculturen werd vastgesteld (aangeduid met “enr.” na de referentie) of in bacteriële isolaten (aangeduid met “bact.”) werd dit met “–“ in tabel 5 aangeduid hoewel het bekomen van aanrijkingsculturen en bacteriële isolaten in principe wel duidt op de mogelijkheid voor in situ afbraak. Geen enkel micro-organisme is momenteel geïdentificeerd dat, als op zichzelf benzeen onder anaërobe omstandigheden volledig kan mineraliseren. Wat wel is aangetoond is dat consortia van verschillende organismen dit kunnen; deze metabolische route is echter vooralsnog onbekend en wordt momenteel onderzocht (The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database; http://umbbd.ahc.umn.edu/).

Tabel 5bis. Referenties waarop tabel 5 werd gebaseerd

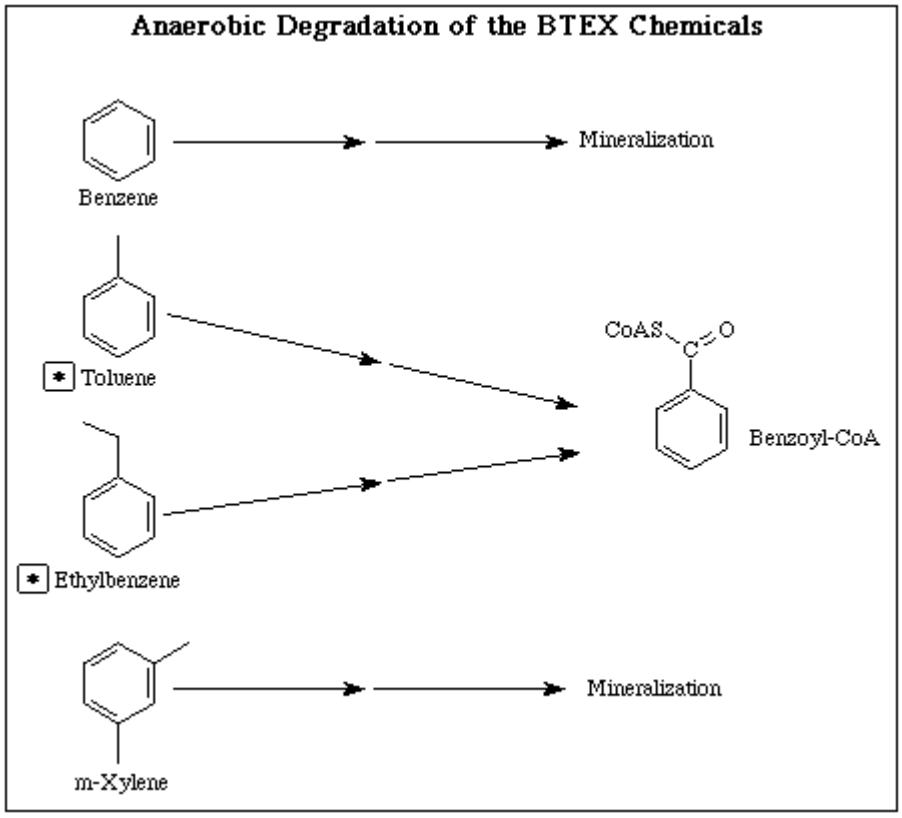
BTEX	NO3	SO4	Fe III	CO2
B		(Lovley et al. 1995) (Gieg et al. 1999) (Nales et al. 1998)	(Anderson et al. 1998) (Anderson and Lovley 1999) (Kao and Wang 2000) (Nales et al. 1998)	(Wilson et al. 1986) (Weiner and Lovley 1998) (Anderson and Lovley 1999) (Weiner et al. 1998)
T	(Flyvbjerg et al. 1993) (Zeyer et al. 1986) (Fries et al. 1994) enr (Evans et al. 1991) enr (Rabus et al. 1999) enr	(Ball and Reinhard 1996) (Davis et al. 1999) (Borden et al. 1995) (Zheng et al. 2001) (Flyvbjerg et al. 1993) (Edwards et al. 1992) (Gieg et al. 1999) (Beller et al. 1995) (Lovley et al. 1995) (Harms et al. 1999) enr (Pelz et al. 2001) enr (Rabus et al. 1993) bact	(Nielsen et al. 1995) (Bjerg et al. 1999) (Borden et al. 1995) (Zheng et al. 2002) (Rugge et al. 1999) (Anderson et al. 1998) (Anderson and Lovley 1999) (Kao and Wang 2000) (Lovley and Lonergan 1990) bact	(Acton and Barker 1992) (Barbaro et al. 1992) (Edwards and Grbic-Galic 1994) (Wilson et al. 1986) (Elshahed et al. 2001) (Gieg et al. 1999) (Anderson and Lovley 1999) (Reinhard et al. 1997) [Johnston, 1996 #629] (Ficker, Krastel et al. 1999) enr
E	(Ball et al. 1996) enr (Rabus et al. 1999) enr	(Gieg et al. 1999)	(Kao and Wang 2000)	(Acton and Barker 1992) (Wilson et al. 1986)
m-X	(Evans et al. 1991) enr (Rabus et al. 1999) enr	(Ball and Reinhard 1996) (Edwards et al. 1992) (Gieg et al. 1999) (Beller et al. 1995) (Harms et al. 1999) enr	(Bjerg, Rugge et al. 1999) (Kao and Wang 2000)	(Acton and Barker 1992) (Reinhard et al. 1997)
p-X	(Haner et al. 1995) enr	(Ball and Reinhard 1996) (Edwards et al. 1992) (Gieg et al. 1999)	(Bjerg, Rugge et al. 1999) (Kao and Wang 2000)	(Reinhard et al. 1997)
o-X	(Evans et al. 1991) enr	(Davis et al. 1999) (Borden et al. 1995) (Zheng et al. 2001) (Edwards et al. 1992) (Gieg et al. 1999) (Beller et al. 1995) (Harms et al. 1999) enr	(Bjerg, Rugge et al. 1999) (Borden, Gomez et al. 1995) (Rugge, Bjerg et al. 1999) (Kao and Wang 2000)	(Acton and Barker 1992) (Edwards and Grbic-Galic 1994) (Wilson et al. 1986)

Enr.: afbraak van bepaalde component onder bepaalde condities aangetoond in aanrijkingsculturen.
Bact.: bacterie geïsoleerd die component afbreekt met bepaalde electronacceptor.

Tabel 6. Overzicht van micro-organismen die de capaciteit hebben om BTEX-componenten te transformeren/metaboliseren in afwezigheid van vrije zuurstof.

BTEX	E⁻acceptor		referentie
Benzeen	Nitraat	(ongedefinieerde cocultuur)	
	Sulfaat	Aquifer	Edwards&Grbic-Galic (1992b)
	CO_2	Aquifer	
Tolueen	Nitraat	*Azoarcus tolulyticus* *Pseudomonas sp.*	Hess et al.(1997)
	Fe(III)	*Geobacter metallireducens*	Lovley & Lonergan (1990)
	Sulfaat	*Desulfobacula toluolica*	Rabus et al. (1993)
	CO_2	Aquifer	
Ethylbenzeen	Nitraat		
	CO_2	Aquifer	
m-Xyleen	Nitraat	*Azoarcus tolulyticus* *Pseudomonas sp.*	Colberg & Young (1995) Hess et al. (1997)
	Sulfaat		
o-Xyleen	Nitraat		
	Sulfaat		
p-Xyleen	Nitraat		
	Sulfaat	*Desulfobacula toluolica*	Rabus et al. (1993)

Voor tolueen en ethylbenzeen is aangetoond dat zij een gemeenschappelijk biodegradatie-intermediair hebben, n.l. benzoyl-CoA. Dit bestanddeel is het meest algemene centrale tussenproduct in de anaërobe afbraak van aromaten. Uiteindelijk wordt acetyl-CoA gevormd (Figuur 3). De anaërobe afbraakroute van xyleen is, zoals voor benzeen, niet goed bekend.



Figuur 3. Anaërobe afbraak van BTEX (The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database; http://umbbd.ahc.umn.edu/)

2.4 Tussenproducten door onvolledige microbiële omzetting

Fermentatie is een onvolledig oxidatieproces dat voorkomt onder zuurstofarme omstandigheden. Hierbij wordt de verbinding gedeeltelijk geoxideerd en gedeeltelijk gereduceerd doordat ze zelf als electronacceptor dienst doet. Tevens wordt waterstofgas gevormd.

Onder zuurstoflimiterende condities vindt vaak een (tijdelijke) ophoping plaats van tussenproducten. Voor BTEX-afbraak zijn de voornaamste tussenproducten fenolen en benzoëzuur. De belangrijkste intermediairen bij de afbraak van alkanen zijn carbonzuren, ketonen, aldehyden en alcoholen.

Naarmate de terminale elektronacceptor meer gereduceerd is wordt een verhoogd gehalte aan alifatische vetzuren waargenomen, in het bijzonder acetaat (Seagren and Becker, 1999). Bij verontreiniging met monoaromatische of polyaromatische koolwaterstoffen afkomstig van petroleumproducten werden ook variaties in de samenstelling van de zuren vastgesteld. Zo bleek de verhouding acetaat/benzoaat groter te zijn onder methanogene dan onder sulfaatreducerende condities. De meting van het voorkomen en van de concentraties van organische zuren kan dus worden gebruikt als indicator van de actieve elektronacceptor.

2.5 Biodegradatie van trimethylbenzenen (TMB)

Trimethylbenzenen hebben een belangrijk aandeel in benzine en kerosines. De volgende drie isomeren worden in belangrijke mate aangetroffen: 1,2,4-TMB of pseudocumeen (0,66-3,30 w% in benzine) 1,3,5-TMB of mesityleen (0,13-1,15 w%) en 1,2,3-TMB of hemimelliteen (0,21-0,48 w%; naar *Leaking Underground Fuel Tank Field Manual, State of California, 1987*).

Biodegradatie van TMB is mogelijk onder aërobe omstandigheden. Deze verloopt echter trager dan de afbraak van BTEX. Op basis van de beschikbare literatuurgegevens wordt aangenomen dat 1,3,5-trimethylbenzeen niet biodegradeerbaar is onder anaërobe omstandigheden. In het protocol voor monitoring van natuurlijke attenuatie van petroleum koolwaterstoffen van Wiedemeier (1995) wordt er gesuggereerd om gebruik te maken van TMB als conservatieve tracer voor natuurlijke attenuatie van benzeen.

Vito heeft in opdracht van OVAM normen uitgewerkt voor TMB. Volgens het New York State Department of Environmental Conservation is de toelaatbare blootstelling voor 1,3,5-TMB slechts 5 maal groter dan die voor benzeen. Omdat trimethylbenzenen minder oplosbaar, vluchtig en biodegradeerbaar zijn dan BTEX kunnen zij de toxiciteit van verweerde benzine domineren.

2.6 Biodegradatie van MTBE

Methyl tertiair butylether (MTBE) wordt gebruikt als een additief voor verhoging van het octaangehalte en het zuurstofgehalte (voor een zuiverdere verbranding) in benzine. Andere zogenaamde oxygenaten zijn ETBE (ethyl-TBE), ethanol, TAME (t-amyl-methylether), isopropylether en TBA (t-butanol). Door zijn lage octanol-

water verdelingscoëfficiënt (log Kow = 1,1), relatief geringe vluchtigheid en grote wateroplosbaarheid (43 g/l) zal MTBE in de ondergrond vooral aangetroffen worden in het grondwater.

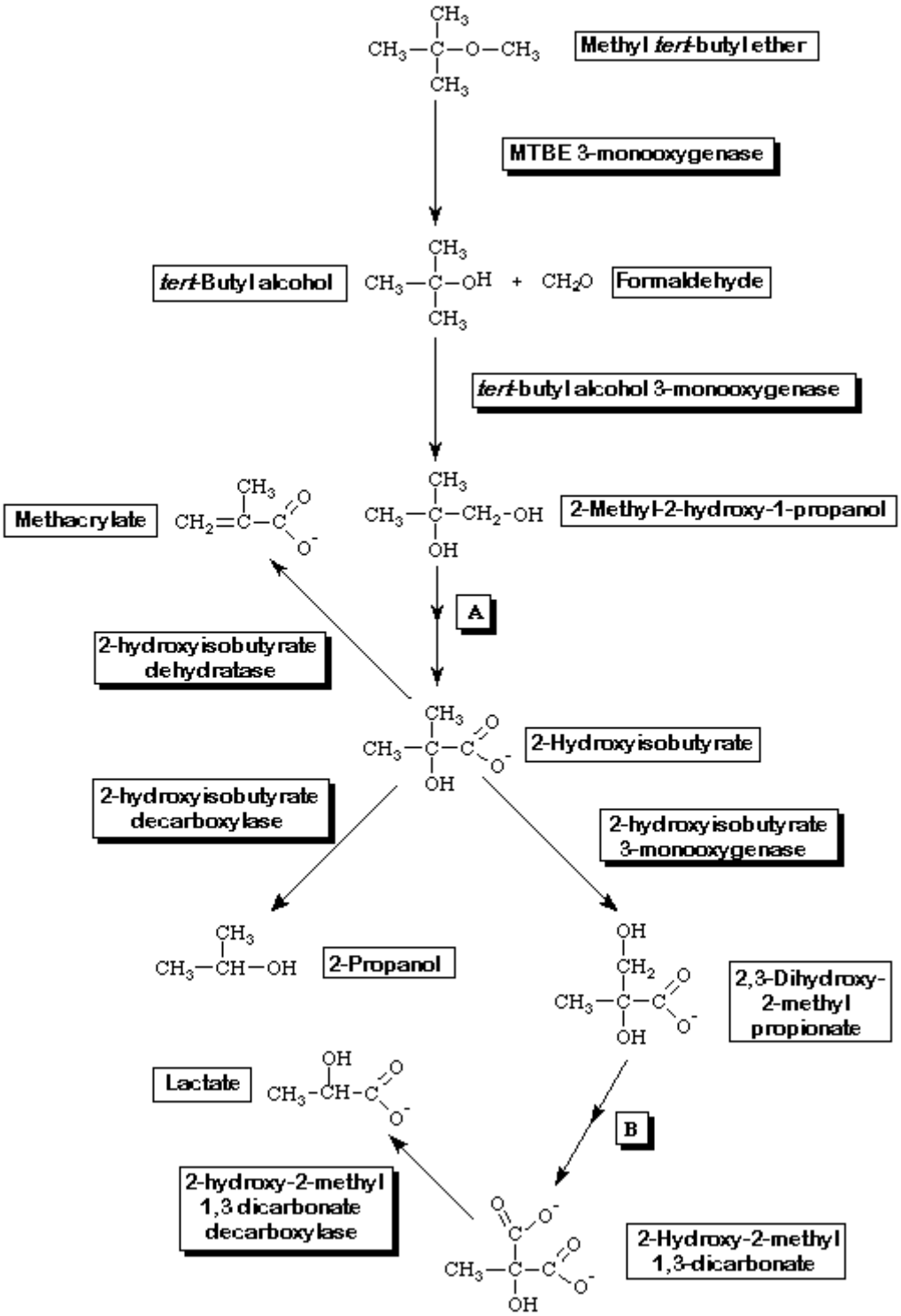
MTBE is in principe biologisch afbreekbaar onder aërobe omstandigheden, maar de biodegradatie ervan verloopt zeer traag. Afbraak werd gerapporteerd onder zowel aërobe als anaërobe omstandigheden. Ook werd cometabolisme van MTBE aangetoond in de aanwezigheid van propaan, butaan, pentaan, hexaan of heptaan en ether. Een recent EPA rapport (2000; EPA/600/R-00/006) beschrijft MTBE afbraak onder methanogene omstandigheden.

Bij aërobe biodegradatie worden formaldehyde en TBA (tertiair butylalcohol) als tussenproducten gevormd, waarvan het laatste tijdelijk kan accumuleren in de aquifer. Onderstaande Figuur 4 vat het reactiemechanisme samen (ontleend aan "The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database"; http://umbbd.ahc.umn.edu/).

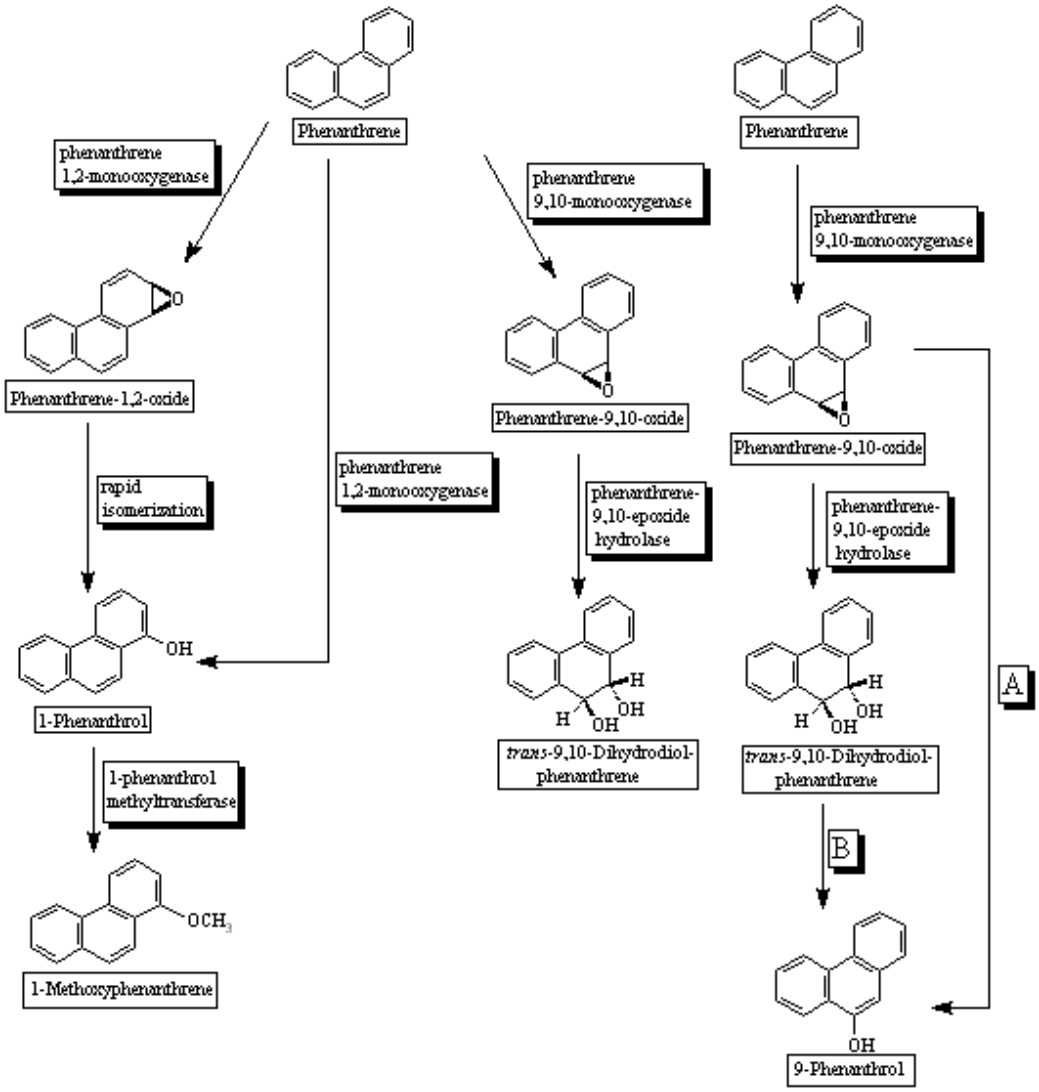
De mechanismen en randvoorwaarden voor biodegradatie van MTBE onder verschillende veldcondities zijn nog onvoldoende gekend. Bovendien is MTBE zeer goed oplosbaar in water en zeer mobiel. De aanwezigheid van MTBE in de kern en/of in de pluim zorgt daarom voor een grote mate van onzekerheid over de slaagkans van (gestimuleerde) natuurlijke attenuatie in vergelijking met verontreinigingen die vooral bestaan uit BTEX.

2.7 Biodegradatie van polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK)

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen zijn in uiteenlopende mate biodegradeerbaar. De afbraaksnelheid neemt doorgaans af met toenemend moleculair gewicht (ringaantal). PAK met 2 (o.a. naftaleen) en 3 ringen (o.a. fenanthreen; zie Figuur 5) worden aëroob redelijk vlot afgebroken, PAK met vier ringen zijn degradeerbaar, doch de afbraak verloopt veel trager. Er is groeiende consensus dat substantiële biodegradatie van 5 of meer-ring PAK niet optreedt tenzij onder bepaalde unieke omstandigheden. Anaërobe afbraak van PAK treedt niet of nauwelijks op, en dan nog enkel voor de 2- en 3-ring PAK's. De PAK-afbraaksnelheid hangt, naast het aantal ringen, ook af van de site-specifieke omstandigheden: beperkende factoren zijn vaak de toevoer van O_2, de uitputting van het substraat, de aanwezigheid van andere, gemakkelijker assimileerbare verbindingen en vooral een te geringe biobeschikbaarheid van de PAK. Niet alleen de toevoer van zuurstof versnelt de afbraak, maar ook sulfaat en Fe(III) kunnen de afbraak versnellen door dienst te doen als alternatieve elektron-acceptoren.



Figuur 4. Aëroob afbraakmechanisme van MTBE. Tussenproducten zijn aangeduid (uit: "The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database")



Figuur 5. Mogelijke aërobe afbraakroutes voor fenanthreen (uit: “The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database”)

3 Methoden voor in-situ bioremediëring

Bij in-situ bioremediëring wordt de biologische afbraak van verontreinigingen in de ondergrond, zonder voorafgaandelijke uitgraving, gestimuleerd. In het algemeen worden de autochtone micro-organismen gestimuleerd door toevoeging van zuurstof (eventueel onder de vorm van ORC®, waterstofperoxide en/of nitraat) en/of nutriënten. Samen hiermee kunnen reagentia worden ingebracht die de oplosbaarheid van de koolwaterstoffen verhogen. Voor het opstarten of versnellen van het proces wordt soms gebruik gemaakt van vooraf geconditioneerde micro-organismen (bioaugmentatie/inoculatie). Deze laatste zijn commercieel beschikbaar maar hun doeltreffendheid in het veld is onzeker.

In de volgende paragrafen zullen de verschillende technieken die worden toegepast bij de bioremediatie van met petroleum verontreinigde gronden worden besproken, waaronder:

- biorestauratie door infiltratie
- bioventing
- biosparging
- bioslurping
- bioaugmentatie
- reactieve wanden of zones
- fytoremediatie.

3.1 Biorestauratie door infiltratie

3.1.1 Techniekbeschrijving

Bij biorestauratie door infiltratie worden de voor biologische groei benodigde voedingsstoffen, zoals nutriënten en zuurstof (of alternatieve elektronacceptoren), in de bodem gebracht, meestal via een waterige fase. Voor de uitvoeringsvormen kan een onderscheid gemaakt worden tussen de biorestauratie van de onverzadigde en de verzadigde zone.

Indien de biorestauratie dient te geschieden in de onverzadigde zone, kan de infiltratievloeistof in de verontreinigde zone worden geïnfiltreerd door gebruik te maken van infiltratiesloten, infiltratievijvers, en/of beregeningsinstallaties. Op deze manieren kunnen bodems met een doorlatendheid groter dan 10^{-5} meter per seconde geïnfiltreerd worden tot een diepte van ongeveer 5 meter (Handboek Bodemsaneringstechnieken, SDU).

Voor infiltratie tot op grotere diepte kan gebruik gemaakt worden van injectiedrains, injectiefilters of geulen die worden opgevuld met poreuze materialen (grof zand of grind). Op deze manier kan de waterfase zich in zowel verticale als horizontale richting over de locatie verdelen. Deze technieken kunnen ook worden toegepast indien de bovenlaag van de bodem een te kleine doorlatendheid heeft.

In de natuurlijke verzadigde zone vindt het transport van de voedingsstoffen naar de micro-organismen hoofdzakelijk in horizontale richting plaats, dit in tegenstelling tot de natuurlijke onverzadigde zone waar het transport hoofdzakelijk in verticale richting plaatsvindt. Dit houdt in dat de infiltratiesystemen voor de biorestauratie door infiltratie in de verzadigde zone doorgaans zullen verschillen van de technieken die worden toegepast in de onverzadigde zone.

Bij een infiltratie in de verzadigde zone wordt water onder druk in de verzadigde zone ingebracht. Hiervoor kan gebruik gemaakt worden van injectiefilters en injectiedrains.

Zowel bij een infiltratie van de verzadigde als van de onverzadigde zone wordt het geïnfiltreerde water terug aan de bodem onttrokken. Dit is aangewezen om ongecontroleerde verspreiding van verontreinigingen en hulpstoffen te minimaliseren en om een bodemspoeleffect te bekomen in de verontreinigde zone. De onttrekking gebeurt rondom de verontreinigde zone in geval van een infiltratie van de onverzadigde zone en stroomafwaarts van de verontreinigde zone voor een infiltratie van de verzadigde zone. Indien slechts een klein verhang wordt waargenomen in de natuurlijke grondwatertafel, wordt een kunstmatige grondwaterstroming gecreëerd door de infiltratie en onttrekking van water.

Het onttrokken grondwater moet worden gereinigd vooraleer te worden gebruikt voor herinfiltratie. Indien toegestaan wordt dat de micro-organismen uit de waterzuivering ook in de bodem worden gebracht, kan dit een versnelling van de afbraak in de bodem bewerkstelligen. De micro-organismen uit de waterzuivering zullen zich namelijk sneller aanpassen aan de specifieke verontreinigingen zodat ze de verontreinigingen ook sneller optimaal kunnen afbreken.

Nadat het onttrokken grondwater gezuiverd is, worden de benodigde voedingsstoffen gedoseerd waarna het water terug in de bodem wordt gebracht. Hiervoor moeten de voedingsstoffen in oplossing worden gebracht.

Voor de aërobe afbraak van verontreinigingen is in de eerste plaats zuurstof nodig, waarvan de meest toegepaste vorm luchtzuurstof is. Omwille van de beperkte oplosbaarheid van luchtzuurstof in water (ca 10 mg/l) kan echter ook gebruik gemaakt worden van technische zuurstof, waterstofperoxide of stoffen die zuurstof langzaam vrijstellen (ORC®).

Met technische zuurstof kunnen zuurstofconcentraties in het grondwater tot 50 mg/l worden bereikt. iSOC (“in situ Submerged Oxygen Curtain”) is een nieuw systeem, dat in peilbuizen kan worden ingebracht en via een sturingsmechanisme kan worden aangesloten op een zuurstofcylinder. De zuurstof wordt dan in het grondwater gebracht door *gas infusie* met een membraansysteem. Hierbij zou het gas direct in oplossing gaan, zonder belletjes te vormen, zodat het proces een veel grotere efficiëntie heeft dan directe injectie van zuurstof. Dit systeem werd door een Canadese firma gepatenteerd en wordt ook verdeeld in Europa door QM Environmental Services Ltd (Schiedam, NL).

Waterstofperoxide kan gebruikt worden om een directe oxidatie te verwezenlijken van organische verontreinigingen of als een zeer goed wateroplosbare vorm van zuurstof. Indien echter te hoge concentraties aan waterstofperoxide worden gedoseerd kunnen voor bacteriën toxische concentraties worden bereikt (vanaf 100-200 mg/l). Een deel van het waterstofperoxide zal verloren gaan door reactie met humus in de bodem of met gereduceerde stoffen zoals ijzer(II). De waterstofperoxide kan ook verdwijnen door zelfdestructie voordat het de gewenste diepte of afstand heeft bereikt. Door deze nevenreacties kan verstopping optreden wegens vorming van neerslagen van ijzeroxide of mangaanoxide. Men kan proberen om het verlies aan waterstofperoxide door reactie met ijzer te onderdrukken door toevoeging van fosfaat aan het infiltratiewater. Het fosfaat zal het ijzer neerslaan zodat dit minder reageert met peroxide. Soms voegt men ook organische stabilisatiemiddelen toe.

ORC (Oxygen Release Compounds, gepatenteerd door Regenesis, USA) zijn vaste metaalperoxiden die niet worden geïnfiltreerd maar die als slurry worden geïnjecteerd in de aquifer, of als sokken met vast materiaal worden aangebracht in peilputten. Het oplossen ervan in het grondwater stelt zuurstof vrij. Hierbij kan de pH plaatselijk sterk verhogen:

$$\mathbf{MgO_2 + H_20 \rightarrow \tfrac{1}{2} O_2 + Mg(OH)_2}$$

De vrijstelling van zuurstof gebeurt traag en continu gedurende 6-12 maanden. ORC systemen zijn daarom geschikt om toe te passen als passieve saneringsmaatregel, in het bijzonder voor sites waar geologische condities niet gunstig zijn voor actieve sanering, b.v. in kleihoudende gronden waar bodemspoeling zeer moeilijk is of in heterogene gronden waar air sparging niet kan wegens preferentiële stroombanen.

In bepaalde gevallen kan men ook alternatieve elektronacceptoren in de ondergrond infiltreren, zoals nitraat of sulfaat, die beide een grote wateroplosbaarheid hebben en dus gemakkelijker in het grondwater kan gebracht worden dan zuurstof. In Vlaanderen is er nog geen of slechts geringe ervaring mee; in het buitenland zijn wel voorbeelden bekend. Reinhard et al. (1997) injecteerden BTEX-houdend grondwater met bromide als tracer (470-1700 L) in een BTEX-gecontamineerde aquifer via een meervoudig injectie/extractiefilter en onttrokken dit vervolgens weer over een periode van 2 à 3 maanden. Om het effect van nitraat- en sulfaatreducerende omstandigheden te bestuderen, werd tevens nitraat of sulfaat geïnjecteerd. In de nitraatconditie werden tolueen, ethylbenzeen en m-xyleen direct (binnen 10 dagen) afgebroken, o-xyleen pas na 72 dagen. In de sulfaatconditie werden tolueen, m-xyleen en o-xyleen volledig verwijderd in minder dan 50 dagen, ethylbenzeen na 60 dagen. Benzeen werd schijnbaar verwijderd onder de sulfaatreducerende omstandigheden, maar de afbraak was niet volledig. Schreiber en Bahr (2002) injecteerden nitraat in een petroleum-verontreinigde aquifer en zagen vervolgens tolueen, ethylbenzeen en de xylenen verdwijnen na een lag-periode van ca. 9 dagen. Benzeen verdween echter niet binnen de 60-dagen durende monitoringperiode. Ze stelde ook vast dat nitraat in veel hogere mate verdween dan stoichiometrisch verwacht voor TEX oxidatie. Dit werd toegeschreven aan nitraatverliezen voor de oxidatie van organische verbindingen ander dan TEX. Een gelijkaardige studie werd verricht door Cunningham et al. (2000, 2001). Zij demonstreerden de mogelijkheid om de anaërobe biodegradatie van BTEX te induceren door gelijktijdige injectie van nitraat én sulfaat. Nitraat werd het eerste verbruikt, in een zone van 4 à 6 m rondom de injectieplaats. Daar trad vervolgens sulfaatreductie op. De totale electronacceptorcapaciteit werd effectief verhoogd. Dit lukte met een mengsel van nitraat en sulfaat beter dan wanneer nitraat of sulfaat afzonderlijk zouden zijn geïnjecteerd. Door meerdere types electronacceptors te gebruiken werd tevens een betere afbraak van alle BTEX verkregen. Benzeenafbraak werd echter pas significant na een lange periode (15 maanden).

Niet alle petroleumkoolwaterstoffen zijn overigens afbreekbaar onder nitraatreducerende omstandigheden (zie hoger). De toediening van nitraat en/of sulfaat dient te gebeuren onder goed gecontroleerde omstandigheden omdat nitraat en sulfaat vanaf een bepaalde concentratie zelf ook worden beschouwd als verontreiniging (resp. 50 en 250 mg/L volgens VLAREM).

3.1.2 Toepassingsgebied

De doorlatendheid van de bodem moet voldoende hoog zijn om infiltratie van water toe te laten. In de literatuur worden minimum doorlatendheden vermeld van 10^{-5} meter per seconde voor infiltratie van de onverzadigde zone en 10^{-6} meter per seconde voor infiltratie van de verzadigde bodem. Daarnaast wordt ook nog een effectieve porositeit van 25 tot 55 procent vereist om infiltratie mogelijk te maken.

Dit houdt in dat biorestauratie door infiltratie vooral zal kunnen worden toegepast in (homogene) zandige gronden. Kleirijke, lemige of sterk gelaagde gronden lenen zich niet tot infiltratie omdat het grondwater zich te traag doorheen deze gronden verplaatst of omdat de infiltratie onvoldoende homogeen kan worden gerealiseerd.

3.1.3 Verontreinigingen

Biorestauratie door infiltratie is het best toepasbaar voor homogeen verspreide verontreinigingen. Indien drijflagen of, meer algemeen, zones met hoge concentraties aan residuele NAPL voorkomen moeten deze worden verwijderd vooraleer de infiltratie te starten.

De lichtere oliemengsels (benzine, diesel, huisbrandolie), aromaten, fenolen en cocktails van deze stoffen kunnen goed worden verwijderd. Een maat voor de toepasbaarheid van biorestauratie door infiltratie bij de sanering is de biologische afbreekbaarheid van de verontreinigingen en de wateroplosbaarheid (Kow).

Een goede biologische afbreekbaarheid is echter geen garantie voor de goede werking van de sanering. Met name de biobeschikbaarheid van de verontreinigingen speelt een grote rol bij de effectiviteit van de sanering. De matrix waarin de verontreiniging zich bevindt is dan ook sterk bepalend voor de effectiviteit van de sanering. Een recente ontwikkeling die kan worden toegepast om de biobeschikbaarheid van koolwaterstoffen te verhogen, zijn *biosurfactants*. Dit zijn biologisch afbreekbare detergenten die de (schijnbare) wateroplosbaarheid van de koolwaterstoffen verhogen en/of de capillaire krachten in de bodem kunnen verlagen (vrijzetten van residuele NAPL).

3.1.4 Beperkingen

Naast de doorlatendheid van de bodem zijn ook de volgende factoren van belang voor het slagen van een biorestauratie door infiltratie:

- ***de hoeveelheid ijzer in het natuurlijke grondwater***. Bij het contact tussen het natuurlijke zuurstofarme grondwater met zuurstof kan ijzer neerslaan en zo onttrekkings- en infiltratieputten laten dichtslibben.

- ***het heterogeen karakter van de bodem***. Bij een heterogeen karakter van de bodem zal het geïnfiltreerde water zich langs preferentiële paden verspreiden zodat niet de volledige grondmassa gereinigd wordt. Het heterogeen karakter van de ondergrond is meestal slecht in te schatten en zal dus voor een onzekerheid zorgen bij de (in-situ) sanering.

- ***microbiële groei in de bodem***. Door de stimulering van de microbiële groei verhoogt de microbiële activiteit zodat de infiltratiemedia kunnen verstopt geraken. Dit wordt ook biofouling genoemd.

- ***technologische problemen***. Bij het inschatten van de vereiste hoeveelheden infiltratieputten dient rekening te worden gehouden met het gegeven dat de infiltratiecapaciteit van een infiltratieput veelal 50 tot 80 % kleiner is dan die van een onttrekkingsput.

- ***mogelijk wegspoelen van de verontreiniging***. Indien de onttrekking van het grondwater slecht gedimensioneerd is of slecht werd ingeplant, bestaat de kans dat de aanwezige verontreinigingen zich met het grondwater zullen verspreiden. Door de verhoogde toevoer van water via de infiltratie zal deze verspreiding zelfs sneller gebeuren dan onder natuurlijke omstandigheden. Eventueel kan ook verdringing van NAPL optreden. Dit moet ten alle tijden vermeden worden, o.a. door middel van een afdoende geohydrologische isolatie.

- ***gebrek aan nutriënten***. De voor microbiële groei aanwezige nutriënten zijn onder normale omstandigheden voldoende voorhanden in de bodem. Bij de verhoogde microbiële werking voor de afbraak van verontreinigingen kunnen deze echter uitgeput raken en moeten ze aan het geïnfiltreerde water toegevoegd worden. De macronutriënten worden toegevoegd als zouten in die hoeveelheden dat de *verhouding koolstof/stikstof/fosfor minimaal 100/10/1* bedraagt. Afwijkende verhoudingen van 100/5/1 tot 100/10/10 worden ook gehanteerd. In principe wordt de optimale verhouding best voorafgaand bepaald door middel van laboratoriumtesten. Micronutriënten komen in de bodem in voldoende mate voor zodat zij niet moeten toegevoegd worden. Omdat niet altijd nutriënten moeten toegevoegd worden, verdient het aanbeveling batchtesten uit te voeren om de eventueel vereiste concentratie aan nutriënten te bepalen. De volgende nutriëntbronnen kunnen ondermeer worden toegepast:

    - ureum: deze stikstofbron heeft een vertraagde werking doordat zij een voorafgaande enzymatische hydrolyse/ammonificatie vereist;

    - ammoniumnitraat: deze stikstofbron is sneller werkend dan ureum wat een voordeel kan zijn om een snelle start van de microbiële omzettingen op gang te brengen, daarnaast kan het nitraat nog als alternatieve zuurstofbron dienen;

  Bij het doseren van de nutriënten moet getracht worden de koolstofbron (m.a.w. de verontreiniging) de limiterende factor te maken voor de bacteriële groei.

- ***geringe biobeschikbaarheid van de verontreinigingen***. Om de biobeschikbaarheid van de verontreinigingen te verhogen, kunnen zoals hoger reeds vermeld additieven zoals detergenten of biosurfactants worden toegevoegd aan het water dat wordt geïnfiltreerd. Deze additieven moeten ongevaarlijk en biologisch afbreekbaar zijn binnen een relatief korte tijd om geen bijkomende verontreiniging in de bodem te introduceren. De eventuele noodzaak voor de inzet van (bio)surfactants kan ook op voorhand worden uitgetest via labo- of pilootschaalonderzoek.

3.2 Bioventing

3.2.1 Techniekbeschrijving

Bij bioventing wordt bodemlucht uit de grond onttrokken door het aanleggen van een onderdruk in één of meerdere luchtonttrekkingsbuizen of –drains. Om de invloedszone van de bioventing te vergroten, kan de luchtonttrekking gepaard gaan met de onttrekking van grondwater. Een vergroting van de invloedszone is vooral van belang indien de verontreiniging gedeeltelijk in de verzadigde zone voorkomt.

Voor de onttrekking van het grondwater kan een afzonderlijk onttrekkingssysteem worden toegepast of kunnen de pompputten voorzien worden voor de gecombineerde onttrekking van lucht en grondwater. In dit laatste geval spreekt men ook van *bioslurping*.

Door het onttrekken van de bodemlucht wordt verse lucht aangetrokken naar de verontreinigde zone. Dit heeft een dubbel effect:

- de vluchtige organische polluenten zullen vervluchtigen en meegevoerd worden met de luchtstroom
- de in de lucht aanwezige zuurstof stimuleert de in de bodem aanwezige micro-organismen die op hun beurt de aanwezige polluenten afbreken.

Indien men louter de vervluchtiging van de polluenten beoogt spreekt men van bodemluchtextractie, bij bioventing ligt de nadruk op de microbiologische afbraak van de polluenten en wordt de bodemluchtextractie louter gebruikt om de benodigde zuurstof in de verontreinigde zone te krijgen. Beide effecten zullen doorgaans echter samen voorkomen zodat de onttrokken lucht nog verontreinigingen kan bevatten. Dit houdt in dat de onttrokken lucht vaak (zeker bij aanvang van de sanering) nog gezuiverd dient te worden.

Met betrekking tot deze beide mechanismen kan het verloop van een bioventing meestal worden opgesplitst in twee fasen. In een eerste fase zal de nadruk liggen op het vervluchtigen van de vluchtige bestanddelen van de verontreiniging. Tijdens deze fase worden de micro-organismen ook voorzien van zuurstof en gestimuleerd tot de afbraak van de verontreinigingen. De tweede fase start dan als de vluchtige componenten verwijderd zijn en de nadruk komt te liggen op de afbraak van de minder vluchtige componenten. De luchttoevoer kan dan verlaagd worden zonder echter de benodigde zuurstoftoevoer naar de micro-organismen in het gedrang te brengen.

Het onttrekken van de bodemlucht gebeurt via luchtfilters. Hiervoor zijn verschillende onttrekkingssystemen beschikbaar:

- ***Verticale filters***. Deze filters worden het meest toegepast maar zijn minder geschikt voor gebruik bij een hoge grondwaterstand. De filters worden geconstrueerd door een gat te boren waarin een kunststof buis wordt geplaatst die op de gewenste diepte voorzien is van perforatie.

- ***Horizontale filters***. Bij een hoge grondwaterstand wordt doorgaans gebruik gemaakt van horizontale filters (drains). Op deze manier wordt de verhoging van het grondwater geminimaliseerd en het te bestrijken

oppervlak vergroot in vergelijking met verticale filters. Indien geen bebouwing aanwezig is kunnen de horizontale filters eenvoudig worden aangebracht. Indien de luchtonttrekking moet plaatsvinden onder gebouwen kan gebruik gemaakt worden van horizontale (gestuurde) boringen. In praktijk blijkt echter dat bij horizontale filters langer dan drie meter, vooral het eerste deel van het filter bodemlucht aanzuigt. In geval men dan een grotere invloedszone wenst, zijn meerdere boringen naast elkaar aangewezen, met een verfiltering op verschillende lengtes.

De hoeveelheid vereiste onttrekkingsfilters en hun inplanting wordt bepaald door de invloedssfeer van de filters. Deze invloedssfeer wordt bepaald door de volgende parameters:

- ***Bodemgesteldheid***. De invloed van de bodemgesteldheid op de invloedssfeer kan door middel van een eenvoudige proefonttrekking bepaald worden. Algemeen kan echter gesteld worden dat voor goed doorlatende zandgronden de invloedsstraal bij een zelfde onderdruk beduidend lager ligt dan bij slechter doorlatende gronden.

- ***Filterdiepte***. Hoe dieper het filter geplaatst wordt, hoe groter de invloedssfeer bij eenzelfde onderdruk. Er kan echter bewust gekozen worden voor een ondieper filter bij eenzelfde onderdruk. Op deze manier wordt de bodem rond dit ondiepe filter namelijk intensiever doorspoeld zodat meer zuurstof in de bodem terechtkomt. Dit wordt vooral toegepast indien een bepaalde zone sterker verontreinigd is dan de rest.

- ***Maaiveldafdichting***. De aanwezigheid van een maaiveldafdichting (folie, asfalt, …) vergroot de invloedssfeer van de onttrekkingsputten. Een maaiveldafdichting voorkomt namelijk de intrede van lucht in de zone waar de afdichting werd aangebracht. Op deze manier wordt lucht aangetrokken uit de zone buiten de afdichting, wat een positief effect heeft op de invloedssfeer.

3.2.2 Toepassingsgebied

De toepasbaarheid van de techniek is grotendeels gelijkaardig als voor bodemluchtextractie (Code van goede praktijk voor bodemluchtextractie en persluchtinjectie; www.ovam.be).

- ***De doorlaatbaarheid van de bodem*** (optimaal bedraagt deze > 10^{-3} meter per seconde of 3m/dag, Handboek Bodemsaneringstechnieken SDU). De doorlatendheid van de bodem bepaalt de weerstand voor de luchtstroming. Grofzandige bodems zullen een kleinere weerstand bieden aan de luchtstroming dan gronden met een fijne structuur (klei, leem) zodat de aanvoer van verse lucht gemakkelijker zal verlopen. De saneringsdoelstellingen zullen dan ook sneller behaald kunnen worden. Bij bodems met een lagere doorlatendheid (10^{-3} tot 10^{-6} meter per seconde) kan bioventing wel worden toegepast, maar zal de effectiviteit kleiner zijn. Om het probleem van een te lage doorlatendheid op te lossen kan theoretisch gebruik gemaakt worden van *fracturing*. Hierbij wordt lucht onder hoge druk in de grond geblazen zodat zich scheuren vormen rondom het injectiepunt. De scheuren kunnen enerzijds worden gegenereerd door gedurende korte tijd perslucht te injecteren (pneumatic fracturing) en anderzijds door water onder druk te injecteren

(hydrofracturing). Indien gebruik gemaakt wordt van pneumatic fracturing, zullen de scheuren zich na 0,5 tot 1 jaar weer sluiten. Indien gebruik gemaakt wordt van hydrofracturing, wordt dit probleem tegengegaan door het injecteren van een poreus medium (bijvoorbeeld een slurry van grof zand en een biodegradeerbaar gel) in de scheuren. In de praktijk wordt fracturing (in Vlaanderen) overigens niet of nauwelijks toegepast.

- ***Graad van homogeniteit van de bodem***. Aangezien bij een heterogene bodem preferentiële luchtstromingen kunnen ontstaan, is de saneringsefficiëntie bij heterogene bodems lager dan bij homogene bodems. Het ontstaan van de preferentiële luchtstromingen houdt namelijk in dat niet in de volledige onverzadigde zone de lucht ververst wordt. Langsheen de preferentiële paden komt een hoger luchtdebiet dan bedoeld en zullen de aanwezige verontreinigingen dan ook over het algemeen sneller worden verwijderd. In de delen van de bodem waar de lucht niet ververst wordt, zal de sanering echter veel trager tot niet doorgaan. De sanering berust in deze delen namelijk op het veel tragere diffusieproces.

- ***Organisch stofgehalte van de bodem***. De aanwezigheid van veel organisch stof geeft aanleiding tot sorptie van organische verbindingen waardoor het moeilijker wordt om de polluenten uit de bodem te verwijderen (geringere biobeschikbaarheid). Dit beïnvloedt niet alleen de saneringsduur maar ook het saneringsresultaat. Organische stofgehalten groter dan 0,3 % kunnen een verhoogd restgehalte aan verontreiniging veroorzaken. Onder invloed van de beluchting kan ook het organisch materiaal zelf versneld afgebroken worden zodat de zuurstofbehoefte kan toenemen.

- ***Het vochtgehalte***. Aangezien de met water gevulde poriën niet kunnen worden doorstroomd met lucht, heeft het vochtgehalte van de bodem een invloed op de doorlatendheid van de bodem. Bij een te droge bodem neemt de adsorptie echter toe. Vooral bij het begin van de bioventing kan de hoeveelheid poriënwater de doorlatendheid verlagen. Na verloop van tijd verdampt het poriënwater echter zodat de doorlatendheid vergroot. Men dient te vermijden dat er te veel bodemvocht wordt afgevoerd door de bodemluchtextractie omdat een optimale microbiële activiteit voorkomt bij een voldoende hoog vochtgehalte. De luchtonttrekking moet net voldoende zijn om de nodige zuurstof aan te voeren, maar niet meer.

3.2.3 Met bioventing behandelbare verontreinigingen

Bioventing kan worden toegepast bij alle polluenten die aëroob kunnen worden afgebroken. De meeste petroleumkoolwaterstoffen vallen onder deze noemer.

Hierbij dient echter rekening te worden gehouden met het gegeven dat bij verontreinigingen met zeer vluchtige parameters (zoals BTEX) de nadruk kan komen te liggen op het vervluchtigen van de verontreiniging uit de bodem en niet zozeer op de stimulering van de afbraak van de polluenten. Daarom dient men het luchtdebiet minimaal te houden om net voldoende zuurstof toe te voegen aan de bodem als vereist is voor de afbraak.

Alkanen met een grote ketenlengte (> C30) worden niet significant verwijderd met deze techniek (slecht biologisch afbreekbaar, geringe biobeschikbaarheid).

Drijflagen of meer algemeen bodemzones met hoge NAPL-gehalten worden best verwijderd voordat er wordt gestart met bioventing. Deze zullen namelijk waarschijnlijk niet afdoende worden afgebroken onder invloed van bioventing (zie verder bioslurping).

3.3 Biosparging

3.3.1 Techniekbeschrijving

Biosparging heeft net als bioventing het doel om luchtzuurstof in de bodem te brengen ter stimulering van de microbiologische afbraak van de verontreinigingen. Bij biosparging wordt de lucht echter in de grond geïnjecteerd via injectiefilters die zich onder de grondwatertafel bevinden. Zo worden de in het grondwater aanwezige verontreinigingen eveneens verwijderd.

De processen die optreden bij biosparging zijn dezelfde als die bij bioventing, te weten vervluchtiging en afbraak van de aanwezige verontreinigingen. De in de lucht aanwezige zuurstof stimuleert de biologische afbraak in zowel de verzadigde als in de onverzadigde zone. Daarnaast worden de vluchtige verontreinigingen uit het grondwater gestript waarna ze in de onverzadigde zone terechtkomen. Hier kunnen de in de lucht aanwezige verontreinigingen worden afgebroken.

Daar mogelijk niet alle verontreinigingen in de onverzadigde zone worden afgebroken, kan de lucht die via het maaiveld wordt uitgestoten nog verontreinigingen bevatten. De bodemlucht moet daarom kunnen worden opgevangen en gezuiverd. Om een gecontroleerde opvang van de lucht mogelijk te maken worden naast de injectieputten meestal ook onttrekkingsputten voor bodemlucht geïnstalleerd in de onverzadigde zone.

Een alternatief, door een Nederlandse aannemer gepatenteerd systeem, bestaat erin een bio-actieve laag aan te brengen in de bovengrond van de zone waarin (biosparging) plaatsvindt. De ontwijkende lucht met gestripte verontreiniging passeert doorheen deze bioaktieve laag waarin biodegradatie van de verontreiniging optreedt. De finaal uittredende lucht zou daarbij geen verontreiniging meer mogen bevatten.

De benodigde lucht bij biosparging kan worden geïnjecteerd met behulp van compressoren met drukvaten of met behulp van blowers. De injectiedruk is afhankelijk van de injectiediepte onder de grondwatertafel en de doorlatendheid van de bodem.

De lucht wordt doorgaans met behulp van verticale filters geïnjecteerd omdat horizontale filters bij lange filterlengten (>2 m) een ongelijke verdeling geven van de ingebrachte lucht. De invloedssfeer van de injectieputten wordt bepaald door de bodemgesteldheid. De invloedssfeer kan echter gecontroleerd worden door de diepte van de filter ten opzichte van de grondwatertafel, de injectiedruk en het luchtdebiet. De laatste jaren heeft men meer positieve ervaring opgedaan met horizontale filters voor persluchtinjectie, onder andere aangebracht via gestuurde boringen.

Het te injecteren luchtdebiet wordt bepaald door de zuurstofbehoefte bij de biodegradatie van de verontreinigingen en door de hoeveelheid aanwezige verontreinigingen. De zuurstofbehoefte kan worden bepaald door het meten van

het zuurstofverbruik in het grondwater bij een *in-situ respiratietest* (start-stop test of push-pull test). Over het algemeen wordt de lucht geïnjecteerd aan debieten van 5 tot 20 m³ per uur en per filter. Indien de vuilvracht bekend is, kan men als vuistregel ongeveer aanhouden dat per kg oliecomponenten ca. 3 kg O_2 noodzakelijk is voor volledige afbraak.

3.3.2 Toepassingsgebied

Net zoals bij bioventing, moet de bodem een voldoende doorlatendheid hebben en voldoende homogeen zijn. Als richtwaarde voor de minimale doorlatendheid van de bodem geldt 10^{-6} m/s.

Een heterogene opbouw van de bodem kan een negatieve invloed hebben op de effectiviteit van de biosparging omdat de grondpakketten met een lagere doorlatendheid minder goed zullen worden doorstroomd. Daarnaast kan de ingebrachte lucht via deze lagen afstromen zodat een ongecontroleerde verspreiding van verontreinigingen naar de omgeving kan optreden. Bij heterogene bodems is het aangewezen om voorafgaand een piloot-test uit te voeren om de invloedsfeer van de injectiefilters te bepalen.

Een hoog gehalte organische stof is nadelig omdat het aanleiding geeft tot een retardatie van de verontreiniging en dus tot hogere restgehalten ervan.

Bij hoge ijzergehalten bestaat de kans op verstopping van de filters door Fe(III)-neerslag, hoewel dit in de praktijk weinig blijkt voor te komen.

Verdere randvoorwaarden aan het toepassingsgebied zijn verder grotendeels gelijkaardig als voor persluchtinjectie (Code van goede praktijk voor bodemluchtextractie en persluchtinjectie; www.ovam.be).

3.3.3 Verontreinigingen

Biosparging kan worden toegepast voor alle verontreinigingen die onder aërobe condities afbreekbaar zijn (zie bioventing). Daarnaast kunnen ook vluchtige verbindingen uit zowel bodem als grondwater worden verwijderd als gevolg van de uitdamping die optreedt bij het doorblazen van de bodem met lucht.

Drijflagen of zones met hoge gehalten aan NAPL worden bij grote voorkeur voorafgaandelijk verwijderd vooraleer de biosparging op te starten. NAPL-zones die enkel uit vluchtige componenten bestaan en niet te omvangrijk zijn kunnen met behulp van (bio)sparging wel worden verwijderd maar hun aanwezigheid kan de duur van de sanering sterk verlengen.

3.3.4 Beperkingen

Afhankelijk van de gebruikte injectieapparatuur, kan de lucht maar tot een beperkte diepte worden ingebracht. De injectieapparatuur moet namelijk de hydrostatische druk van het grondwater overwinnen en dan nog een voldoende injectiedruk kunnen leveren. Indien gebruik gemaakt wordt van compressoren kunnen verontreinigingen tot op grotere diepte worden verwijderd in vergelijking met het gebruik van blowers.

3.4 Bioslurping

3.4.1 Techniekbeschrijving

Bij bioslurping worden meerdere fasen tegelijkertijd uit de bodem onttrokken zodat de techniek onder de tweefasen of multifasenonttrekking valt. Systemen voor bioslurping maken gebruik van een of meerdere (hoogvacuüm)pomp(en) voor het onttrekken van zowel de lucht-, de NAPL- als de waterfase. Hierbij wordt de onttrekking meestal ter hoogte van de grondwatertafel aangebracht. Deze systemen beogen een luchtstroom met een hoge snelheid te creëren waarbij water- en NAPLdruppels worden meegezogen. Een sterk verlaagde druk resulteert verder in de verdamping van vluchtige NAPL (verwijdering via de dampfase) en een grotere hydraulische gradiënt zodat een beter rendement kan worden behaald voor de onttrekking van zowel de lucht-, de NAPL- als de waterfase. Deze opstelling kan zeer effectief zijn voor het verwijderen van drijflagen. Door gebruik te maken van bioslurping, kunnen de verontreinigingen in de verzadigde en de onverzadigde zones gelijktijding worden gesaneerd. De techniek werd in eerste instantie ontwikkeld om een maximale extractie te bekomen, maar stimuleert daarbij ook de biodegradatie van petroleumprodukten in de onverzadigde zone door een aanvoer van zuurstof. In dit opzicht is de techniek gelijkaardig aan bioventing.

3.4.2 Toepassingsgebied

De toepasbaarheid van bioslurping is in eerste instantie afhankelijk van de bodemgesteldheid en in mindere mate van de eigenschappen van de verontreiniging; fijne en siltige zanden met een hydraulische conductiviteit $K = 10^{-5}$ tot 10^{-7} m/s zijn meest geschikt maar ook kleiige gronden komen in aanmerking, zolang de doorlaatbaarheid niet te laag wordt.

Het gebruik van een hoge onderdruk heeft als bijkomend voordeel dat NAPL-verontreiniging die in de poriën gevangen gehouden worden door capillaire krachten kleiner dan de atmosferische druk, kunnen vrijkomen. Hierdoor kunnen grotere hoeveelheden vrij product worden gerecupereerd dan met klassieke drijflaagverwijderingssystemen (gebaseerd op toestroming door de zwaartekracht).

Bij een fluctuerende grondwaterstand zal de positie van de aanzuigbuis regelmatig moeten gecontroleerd worden om te voorkomen dat slechts één fase kan worden opgezogen. Er bestaan overigens ook systemen zonder haalbuis (zie Code van goede praktijk: pump & treat; www.ovam.be).

3.4.3 Verontreinigingen geschikt om te worden aangepakt via bioslurping

Bioslurping voldoet voornamelijk voor vluchtige stoffen en voor verontreinigingen die aëroob kunnen worden afgebroken. Indien ze in het grondwater aanwezig zijn, kunnen ook niet-afbreekbare verbindingen worden verwijderd. Deze verontreinigingen worden mee opgepompt en kunnen dan bovengronds uit het grondwater worden verwijderd.

3.5 Bioaugmentatie

3.5.1 Techniekbeschrijving

Bij bioaugmentatie worden (speciaal voor dit doel opgegroeide) micro-organismen in de bodem gebracht om de afbraak van de verontreinigingen te versnellen. Deze organismen zijn specifiek aangepast om de aanwezige verontreinigingen af te breken. Het toevoegen van organismen is geen sanering op zich maar moet gezien worden als een ondersteunende maatregel. Voorzieningen die de groei van de organismen verzekeren (zoals toevoeging van electronacceptor, nutriënten,…) moeten bijkomend toegepast worden.

Het inbrengen van micro-organismen in de bodem kan om verschillende redenen worden toegepast:

- sommige verontreinigingen worden door de natuurlijke populaties te traag afgebroken om efficiënt te worden verwijderd;
- de voor de afbraak benodigde micro-organismen zijn niet of in onvoldoende mate aanwezig.

Bij in-situ sanering kunnen de micro-organismen op twee manieren aan de bodem worden toegevoegd:

- *rechtstreeks inmengen in de bodem*. Deze methode wordt vooral toegepast bij lichte verontreinigingen die vrij ondiep aanwezig zijn (tot 1 meter onder het maaiveld). De micro-organismen kunnen, samen met voedingsstoffen, gemakkelijk onder de verontreinigde grond worden gemengd met behulp van klassieke landbouwtoestellen;

- *in-situ/on site systemen*. Bij deze manier wordt verontreinigd grondwater opgepompt en on site biologisch gereinigd. Het effluent van de waterzuiveringsinstallatie, dat zuurstof, nutriënten en aangepaste micro-organismen bevat, wordt dan terug in de grond geïnjecteerd om de verontreinigingen in de onverzadigde zone af te breken. Dit proces combineert een ex-situ grondwaterreiniging met een in-situ bodemreiniging.

- Als variant op deze techniek kunnen de benodigde micro-organismen samen met voedingsstoffen in suspensie worden gebracht en in de grond geïnjecteerd. Hierbij dient men er zorg voor te dragen dat de bodem verzadigd wordt omdat micro-organismen te traag door een onverzadigde zone migreren.

Infiltratie en verspreiding van bacteriën in de bodem verloopt vaak moeizaam omdat deze een geladen celwand hebben en de eigenschap hebben om zich aan de bodemdeeltjes vast te hechten. Om dit probleem te minimaliseren, kan geopteerd worden om te werken met ‘uitgehongerde’ organismen. Omdat deze kleiner zijn (nano- of microbacteriën), zullen zij zich gemakkelijker verplaatsen. Sommige bedrijven bieden speciaal geselecteerde bacteriën aan die relatief weinig sorptie vertonen. Om het probleem van de beperkte migratie-afstand te omzeilen kan men ook gebruik maken van de punt-infiltratie techniek. Hierbij wordt een zeer groot aantal infiltratieputten aangebracht met zeer korte tussenafstanden om bacteriën en nutriënten periodiek te infiltreren. Er zijn ook voorbeelden bekend

waarbij een elektrisch veld werd aangelegd in de bodem om de bacteriën gecontroleerd te verplaatsen.

In vele gevallen zal men de applicatie meerdere malen moeten herhalen omdat de toegevoegde bacteriën niet lang overleven in de bodem. In enkele gevallen kan men gebruik maken van stammen of consortia die zich onder zeer gecontroleerde omstandigheden in de bodem kunnen vermenigvuldigen en handhaven.

3.5.2 Toepassingsgebied

Bioaugmentatie is in hoofdzaak een ondersteunende techniek die kan toegepast worden indien de biologische activiteit niet hoog genoeg is om met een andere techniek een voldoende snelle afbraak te verzekeren. Meer bepaald zal in de volgende vier situaties het gebruik van bioaugmentatie moeten worden overwogen:

- ***lage bacterie telling***. Indien minder dan 10^5 organismen per gram bodem of per ml grondwater aanwezig zijn die de verontreiniging kunnen afbreken, zal de afbraak van de verontreinigingen te traag verlopen. Deze situatie kan zich voordoen in nutriëntarme bodems of in bodems die toxische of inhiberende stoffen bevatten.

- ***herstel na niet biologische ingrepen***. Indien de bodem naast biologisch afbreekbare verontreinigingen nog een aantal verontreinigingen bevat die fysisch of chemisch moeten worden verwijderd vooraleer de biologische reiniging kan starten, moet de biologische activiteit misschien kunstmatig hersteld worden.

- ***indien snelheid vereist is***. Indien de sanering relatief snel moet verlopen kan het aangewezen zijn om een organisme toe te voegen zodat de afbraak van de verontreinigingen direct kan beginnen. Indien inhiberende stoffen aanwezig zijn of indien de verontreinigingen een lange adaptatietijd vereisen, kan bioaugmentatie de sanering aanzienlijk versnellen.

- ***bij onvoldoende zekerheid betreffende de aanwezige populaties.*** Indien de natuurlijke populaties niet gekend zijn en er geen tijd of geld beschikbaar is voor een nauwkeurig onderzoek, biedt bioaugmentatie een zekerheid dat de nodige organismen in de bodem aanwezig zijn om de verontreinigingen aan te pakken.

3.5.3 Verontreinigingen waarvoor bioaugmentatie kan worden overwogen

Bioaugmentatie kan worden toegepast voor alle biologisch afbreekbare verontreinigingen. De bepalende factor voor de bruikbaarheid van bioaugmentatie is de beschikbaarheid van een geschikt micro-organisme. Vaak moet men gebruik maken van een consortium van verschillende aangepaste stammen.

3.6 Bioschermen

3.6.1 Techniekbeschrijving

Bioschermen zijn ondergrondse structuren of zones die passerend gecontamineerd grondwater in situ reinigen. Bioschermen op bodemvreemd dragermateriaal worden aangebracht door een sleuf te graven dwars op de grondwaterstromingsrichting en deze op te vullen met een materiaal waarop zich een biofilm ontwikkelt waarvan men de microbiële biodegradatieactiviteit stimuleert. De sleuf moet zo worden aangebracht dat het verontreinigde grondwater er doorheen stroomt.

Het materiaal dat gekozen wordt om de sleuf op te vullen is afhankelijk van het type verontreiniging dat uit het grondwater moet worden verwijderd. De verontreinigingen die zich in het grondwater bevinden moeten ofwel sterk worden gesorbeerd door het reactief materiaal ofwel er door worden omgezet in schadeloze producten.

Het biologisch actieve materiaal dat de eigenlijke zuivering van het grondwater uitvoert wordt vaak gemengd met een poreus materiaal zoals grof zand om zo een grotere doorlatendheid te verkrijgen dan de omliggende grond. Hierdoor zal het verontreinigde grondwater preferentieel door de reactieve wand stromen zodat een grotere zekerheid wordt bekomen dat al het grondwater gereinigd wordt.

Het specifieke materiaal dat wordt ingemengd wordt gekozen op basis van de verontreiniging die moet worden verwijderd. De verschillende materialen vervullen hun taak op basis van de volgende processen: sorptie, precipitatie en biodegradatie.

In een bioscherm wordt een zuurstofbron en nutriënten ingebracht om de micro-organismen te stimuleren die zich in de bodem en het grondwater bevinden. Deze micro-organismen ontwikkelen zich op het dragermateriaal en zullen de verontreinigingen omzetten naar niet of minder toxische producten. Het dragermateriaal moet een betere doorlatendheid hebben dan de omgevende bodem om een goede doorstroming mogelijk te maken en het risico op verstopping door biofouling te minimaliseren.

Het grote voordeel dat bioschermen in dit geval hebben ten opzichte van de ‘meer klassieke’ pump and treat (geohydrologische beheersing) technieken, is dat het een beheersingstechniek is waarmee de verontreinigingen in-situ wordt afgebroken. Omdat er geen grondwater moet opgepompt worden, is er geen elektriciteit en een dure bovengrondse waterzuivering nodig tijdens de sanering. Slechts een deel van de pluim wordt actief behandeld (pluimbeheersing).

3.6.2 Verontreinigingstypes saneerbaar via bioschermen

Bioschermen die gebruik maken van biodegradatie kunnen worden toegepast bij alle biologisch afbreekbare verontreinigingen die in voldoende mate oplossen in het grondwater. In praktijk zal de verontreiniging zich hoofdzakelijk in het grondwater moeten bevinden om het gebruik van reactieve wanden effectief te maken. Bioschermen zijn doorgaans niet geschikt om drijflagen te behandelen.

3.6.3 Toepassingsgebied

De verontreinigingen mogen zich niet te diep bevinden (maximaal 10-20 m-mv), zoniet wordt het technisch onmogelijk of te duur om een bioscherm te installeren.

Omdat het rendement van het bioscherm mede afhankelijk is van de toestroming van het verontreinigde grondwater naar de wand, zullen bioschermen meestal worden toegepast in zandige, voldoende poreuze gronden. De bodem moet een voldoende grondwaterdebiet toelaten om de verontreinigingspluim binnen een aanvaardbare termijn te saneren, tenzij een 'eeuwigdurende' beheersing wordt nagestreefd.

Een tweede beperking bij het gebruik van bioschermen is de sorptiegraad van de verontreinigingen aan de bodemdeeltjes. Omdat de techniek erop gebaseerd is de verontreinigingen via het grondwater naar de biologisch actieve wand te voeren, moeten de verbindingen in kwestie voldoende mobiel zijn (lage Kow). Alleen de verontreinigingen die zich in het grondwater bevinden en met het grondwater door het bioscherm stromen zullen worden verwijderd. Voor minder oplosbare verontreinigingen zullen bioschermen doorgaans ook minder geschikt zijn.

Ten derde dient bij het ontwerp van een bioscherm rekening te worden gehouden met het feit dat de werking van de wand (al dan niet tijdelijk) kan stilvallen. Zo kunnen de zuurstofbron of de nutriënten uitgeput raken zodat de microbiologische activiteit stilvalt. Het is ook mogelijk dat de permeabiliteit van de wand afneemt met de tijd omwille van verstopping door accumulatie van biomassa en anorganische neerslagen.

Het bioscherm is in Vlaanderen nog een innovatieve, niet bewezen techniek. In het buitenland zijn er echter wel succesvolle piloot- en full-scale bioschermen geplaatst, o.a. in Nederland in het kader van het Nobis programma.

3.7 Fytoremediatie

3.7.1 Techniekbeschrijving

Fytoremediatie is het gebruik van planten bij de verwijdering van verontreinigingen uit de bodem, slib of grondwater. Dit kan gebeuren via verschillende processen:

- ***fytodegradatie***. Hierbij worden de verontreinigingen door de plant opgenomen en afgebroken door metabolische processen in de plant of worden door de plant enzymes uitgescheiden die de verontreinigingen buiten de plant afbreken. De afbraakprodukten die hierbij vrijkomen kunnen dan door de plant worden opgenomen. In beide gevallen worden de polluenten afgebroken tot eenvoudigere moleculen en ingebouwd in het celweefsel van de plant. Dit proces is waarschijnlijk niet belangrijk voor petroleumkoolwaterstoffen.

- ***rhizodegradatie.*** Bij rhizodegradatie gebeurt de afbraak van de verontreinigingen door microbiële activiteit in de bodem. Deze microbiële activiteit wordt gestimuleerd door de aanwezigheid van de wortelstelsels van de aanwezige planten door de aanvoer van zuurstof en water. Een bijkomend voordeel van rhizodegradatie is dat de aanwezige micro-organismen zich sneller door de bodem kunnen verspreiden indien ze

geabsorbeerd zijn aan de wortels. Op deze manier kunnen aan de verontreiniging aangepaste micro-organismen sneller een groter volume verontreinigde grond koloniseren. Dit proces is belangrijk voor de afbraak van petroleumkoolwaterstoffen in de bodem en het grondwater.

- ***evapotranspiratie.*** Na opname door de plant kunnen de verontreinigingen ook getransporteerd worden naar de bladeren van de plant. Hier kunnen de verontreinigingen worden uitgescheiden door verdamping. De planten zorgen hierbij voor een versnelde verdamping zodat de verontreinigingen sneller uit de bodem verdwijnen. Dit proces kan bijdragen tot de verwijdering van BTEX, vluchtige koolwaterstoffen en MTBE uit de bodem en het grondwater. Het veroorzaakt echter een verschuiving van het probleem naar een ander milieucompartiment.

- ***fytostabilisatie.*** In dit geval worden planten gebruikt om verontreinigingen te immobiliseren door adsorptie aan en absorptie en accumulatie in de wortels, neerslagvorming in de wortelzone of door fysische stabilisatie van de bodem. Dit proces vermindert de verplaatsing van verontreinigingen naar het grondwater of de atmosfeer. Het kan een nuttige rol spelen bij vastlegging van hydrofobe koolwaterstoffen in de onverzadigde bodem.

Slechts de eerste twee processen zorgen voor een afbraak van de verontreinigingen, evapotranspiratie verplaatst de verontreinigingen slechts naar de lucht. Dit is een proces dat echter moeilijk tot niet te sturen is.

Ondanks de mogelijkheid dat een gedeelte van de aanwezige verontreinigingen vervluchtigt naar de atmosfeer, biedt fytoremediatie toch voordelen:

- het gebruik van planten is vanuit esthetisch oogpunt te verkiezen boven de traditionele systemen
- het onderhoud van de planten is veelal goedkoper en eenvoudiger dan de klassieke bioremediatietechnieken

3.7.2 Toepassingsgebied

Fytoremediatie kan worden toegepast in alle gronden die plantengroei toelaten, d.w.z. in de meeste gronden. Wel moet de verontreiniging voor de planten bereikbaar zijn. Dit houdt in dat de verontreiniging zich niet te diep in de ondergrond mag bevinden. Indien gebruik gemaakt wordt van bomen waarvan de wortels vrij diep in de bodem doordringen (bv. populieren), kan ook (een deel van) het grondwater gesaneerd worden (tot ongeveer 3-6 m-mv).

Indien de diepte van de aanwezige verontreinigingen een probleem oplevert, kan geopteerd worden om de verontreinigde gronden af te graven en op hopen te leggen. In tegenstelling tot de klassieke bioremediatietechnieken, waarbij de hopen regelmatig gekeerd worden, kunnen deze worden ingezaaid of beplant. De planten zorgen dan voor de aanvoer van zuurstof en nutriënten voor de afbraak van de verontreinigingen.

De aanwezige verontreinigingen mogen echter geen sterke groeiremmende invloed uitoefenen op de planten. In gronden met een sterke olieverontreiniging kan de aanwezige olie het voor de planten onmogelijk maken om water op te nemen. In dit geval sterft de plant af. Daarnaast kunnen de verontreinigingen ook toxische eigenschappen bezitten voor de planten.

In het algemeen kan gesteld worden dat fytoremediatie kan worden toegepast bij ondiep voorkomende verontreinigingen in relatief lage concentraties.

Voor toepassing van fytoremediatie is meestal een grote beschikbare oppervlakte vereist, dit is in Vlaanderen meestal niet evident. De toepassing van fytoremediatie is voorts seizoensgebonden. Indien de plant niet groeit, kan ook geen afbraak van verontreinigingen plaatsvinden. Dit houdt in dat een sanering met fytoremediatie marginaal kan zijn gedurende het winterseizoen.

3.7.3 Verontreinigingen die met fytoremediatie kunnen worden gesaneerd

Fytoremediatie werd reeds succesvol toegepast bij de afbraak van verschillende olieproducten (ruwe aardolie, diesel, PAK's,…). De techniek is niet succesvol voor verontreinigingen die sterke sorptie aan de bodemdeeltjes vertonen, b.v. zware PAK's of hoogmoleculaire alkanen.

Voor sanering van het grondwater komen enkel stoffen in aanmerking die kunnen worden opgenomen door de plant. Dit zijn stoffen met een niet te sterke hydrofobiciteit: een log K_{ow} tussen 1 en 3,5 is gunstig. Stoffen die zeer hydrofoob zijn worden te sterk gebonden aan de bodem of de wortels voor opname. Stoffen met een te hydrofiele aard worden niet voldoende gesorbeerd door de wortels en getransporteerd doorheen de membranen van de plant.

4 Richtlijnen voor uitwerking van een bioremediatievariant in bodemsaneringsprojecten

4.1 Algemene aspecten

Voordat bioremediatie (zoals dit ook geldt voor andere saneringswerkwijzen) kan worden geaccepteerd als geselecteerde voorkeurssaneringsvariant in bodemsaneringsprojecten dient door de betrokken bodemsaneringsdeskundige een haalbaarheidsonderzoek te worden uitgevoerd.

Tijdens dit onderzoek dient de haalbaarheid van de geselecteerde bioremediatievariant om de vooropgestelde saneringsdoelstellingen te behalen, te worden onderbouwd. Zeker indien het een omvangrijke verontreiniging betreft, dient op kleinere schaal de haalbaarheid ervan (termijnen, haalbare rendementen, risico's van achterblijvende pollutie en/of gevormde intermediairen,…) te worden beoordeeld.

De belangrijkste criteria voor de accepteerbaarheid van bioremediatie als saneringstechniek zijn:

1. dat de verontreiniging(en) volledig biologisch afbreekbaar is (zijn) onder de omstandigheden zoals die tijdens de sanering voorkomen op de locatie;
2. dat een afdoende monitoring wordt uitgevoerd (welke aantoont dat de afbraak (optimaal) optreedt en blijft optreden, in voldoende mate om de vooropgestelde saneringsdoelstellingen te verwezenlijken);
3. dat de saneringsdoelstellingen bereikt worden binnen een aanvaardbare termijn en dat deze saneringsduur niet onevenredig lang is t.o.v. andere mogelijke saneringstechnieken.
4. OVAM dient met voldoende en objectieve gegevens overtuigd te worden dat tijdens en na afloop van de sanering potentiële receptors beschermd zijn en blijven en dat er geen significante toename is van de verontreinigingspluim;
5. Indien de saneringsdoelstellingen na verloop van tijd niet worden gehaald dan dient een meer actieve variant van bodemsanering te worden ingeschakeld. Deze 'terugvaloptie' dient reeds te worden voorzien en uitgewerkt in het bodemsaneringsproject.

De specifieke criteria die de uiteindelijke aanvaardingsvoorwaarden voor een bioremediatievariant bepalen zullen afhangen van site-specifieke omstandigheden, meer bepaald de wisselwerking tussen de chemische, hydrogeologische en biochemische randvoorwaarden met betrekking tot de optredende verontreiniging(en).

- De haalbaarheid van de biologische afbraak van de verontreiniging moet aangetoond worden met een aanvaardbaar betrouwbaarheidsniveau, de verwachte saneringsduur moet eveneens onderbouwd zijn. Er moet voldoende tijd beschikbaar zijn om de vooropgestelde saneringsdoelstelling te bereiken; de effecten van de hydrogeologische omstandigheden en fysico-chemische eigenschappen van de verontreiniging moeten voldoende in beeld gebracht zijn. Ook het belang van de aquifer (naar drinkwaterwinning toe) is een belangrijk evaluatiecriterium. Aangetoond dient te worden dat het voorziene landgebruik na de bioremediatie niet botst met de (lange termijn) randvoorwaarden eigen aan de vooropgestelde saneringsdoelstelling (voor een industriegebied is bijvoorbeeld een minder strenge saneringsdoelstelling aanvaardbaar dan voor woongebied en is dus een bioremediatievariant mogelijk gemakkelijker accepteerbaar). De verontreinigde zone moet steeds

bereikbaar blijven voor monitoring; het is raadzaam hierover op voorhand met derden (v.b. buurterreinen) te overleggen.

- Steeds dient aangetoond in de loop van de bioremediatie, dat de geïdentificeerde potentiële receptors op korte en lange termijn beschermd zijn en blijven en in geen geval (eco- en humaan-) toxicologische risico's kunnen optreden. De verontreinigingspluim van oorspronkelijk product of van tijdens de bioremediatie ontstane dochterproducten (vb. trimethylfenolen) mag zich niet uitbreiden met meer dan 10% of met meer dan 100 m (en daarbij receptors of nog ongecontamineerd grondwater bedreigen).
- Een *gedetailleerde reservevariant* dient te worden uitgewerkt om te worden opgestart in het geval de bioremediatievariant niet blijkt te voldoen aan de vooraf gedefinieerde saneringsdoelstellingen.

In het bodemsaneringsproject dienen volgende aspecten van de geselecteerde bioremediatievariant te worden uitgewerkt:

- <u>Technische haalbaarheid</u>, gebaseerd op de contaminanteigenschappen (fysische/chemische/biologische eigenschappen, afbreek-/omzetbaarheid en toxiciteit) en bodem- en aquifer karakteristieken; beschrijving van het gedrag en de evolutie van de verontreiniging, o.m.:
    - *Vuilvracht, concentraties, omvang; transportsnelheid moeder- en dochterproducten;*
    - *Aanwezigheid van en (actueel of potentieel) risico voor receptors;*
    - *Zijn de omstandigheden op de locatie globaal geschikt voor biologische afbraak of kunnen de omstandigheden op de locatie geschikt gemaakt worden voor biologische afbraak.*

- <u>Praktische haalbaarheid</u>
    - *Is de toekomstige terreinbestemming goed vastgelegd? (kadert de sanering al dan niet in overdracht: zijn er geen onzekerheden naar toegankelijkheid, risico's,… gedurende de totale duur van de sanering);*
    - *Wat is de eigendomssituatie van buurpercelen (waarop mogelijke verspreiding optreedt; toegankelijkheid voor monitoring, e.d.);*
    - *Bij het beschikbaar komen van nieuwe saneringsinzichten/mogelijkheden dienen deze tijdens het verloop van de bioremediatie te worden beoordeeld op inzetbaarheid, afhankelijk met het al dan niet gunstig verloop van de bioremediatie.*

- <u>Economische haalbaarheid</u>
    - *Voorafgaandelijk onderzoek naar de haalbaarheid van een bioremediatievariant vergt een inspanning die op zich reeds een aanzienlijke kost kan inhouden;*
    - *Kosten voor lange-termijn monitoring kunnen hoog oplopen: zijn de kosten correct ingeschat, rekening houdend met lange-termijn financiële overwegingen (inflatie, kapitalisatie,…);*
    - *Inschatting van de kans dat uiteindelijk toch de reservevariant noodzakelijk is (kostenraming bioremediatie dient reservevariant te bevatten)*
    - *Wegen lange-termijn kosten van de bioremediatievariant op tegen korte-termijn kosten voor een 'actievere' saneringsvariant: een betrouwbare kosten-baten analyse is een essentieel onderdeel in de totale beoordeling van bioremediatie als saneringsoptie (vb. keuze tussen afgraven olieverontreiniging en bioremediatie ervan: de*

kosten voor het haalbaarheidsonderzoek in combinatie met langere termijn voor monitoring en een eventuele meerkost voor het inroepen van een reservevariant wegen mogelijk niet op tegen de kosten voor ontgraving en off-site verwerking).

- Acceptatie door publieke opinie en bevoegde overheid
  - *Onzekerheid over al dan niet bestaan (of ontstaan) van risico's*
  - *Onzekerheden van een biologische saneringswijze in het algemeen, afgewogen tegen zekerheid van alternatieve saneringstechnieken: bij twijfel kiest men voor de zekerste techniek*
  - *Opname voor langere tijd van betrokken perce(e)l(en) in register van verontreinigde gronden; ook bijvoorbeeld omdat haalbare terugsaneerwaarden mogelijk boven de grenswaarden blijven voor opname in het register.*

.

In het kader van de voorstudie van het haalbaarheidsonderzoek van een bioremediatievariant dienen minimaal de volgende gegevens te worden verzameld, beoordeeld en opgenomen in het bodemsaneringsproject:

A. Verontreinigingsparameters

- Omvang en locatie brongebied(en) (horizontaal en verticaal afgeperkt; aanduiding op plan);
- Omvang en locatie pluimgebied (horizontaal en verticaal afgeperkt; aanduiding op plan);
- Concentraties in bron- en pluimzones;
- Vuilvrachten (massa aan verontreiniging) in bron- en pluimzones voor de verschillende van toepassing zijnde bodemcompartimenten (vaste fase, water- en luchtfase; aanwezigheid van puur product?). Ook de gekende afbraakproducten dienen in kaart te worden gebracht (vastleggen nulsituatie vóór de start van de bioremediatie);
- Oorzaak en ouderdom van de verontreiniging;
- Achtergrondconcentraties in de omgeving; aanduiding van eventuele andere bronnen van verontreiniging in de omgeving;
- Biologische afbreekbaarheid van de verontreiniging.

B. Karakteristieken van de ondergrond

- Belangrijke of minder belangrijke watervoerende laag?
- Waterwinning actueel of potentieel?
- Grondwaterstromingsparameters:
  - doorlaatbaarheid, porositeit, hydraulische gradiënt, stroomsnelheid,
  - stromingsrichting en variaties in stromingsrichting,
  - gelaagdheid, preferentiële stroombanen, e.d.

C. Receptoren

- Locatie van actuele of potentiële receptors (aquifers, (drink)waterwinningen, oppervlaktewater, woon- of natuurgebied, e.d.).

In tabel 7 worden de acceptatiecriteria voor een bioremediatievariant samengevat.

Tabel 7: Samenvattende tabel criteria voor acceptatie bioremediatievariant

Factoren	Haalbaarheid bioremediatievariant	
	Goed	**Mogelijk problematisch**
A. Technische		
NAPL-zone/drijflaag	verwijderd	aanwezig/omvangrijk
Afbreekbaarheid van de verontreiniging onder site-specifieke omstandigheden *	goed	slecht of onzeker
Dochterproducten *	worden ook afgebroken/ leveren geen risico	accumuleren/ vormen een risico
Co-contaminanten	geen	aanwezig (afbraakremmende stoffen)
Bodemheterogeniteit/ voorkeursbanen	homogeneen	heterogeen/sterk gelaagd/niet-doorspoelde zones
Receptor aanwezigheid		
- Actueel:	afwezig	aanwezig; hoog risico
- Potentiëel:	afwezig	aanwezig; hoog risico
Nabijheid grondwater-beschermingszone of –wingebied	Nee	ja
Zekerheid m.b.t. vuilvracht, verdeling over bodemfasen en 3-dim. omvang verontreiniging	Hoog	laag (vb. onzekerheid aanwezigheid puur product)
B. Bevoegde instantie: Acceptatiemogelijkheden	geen beleidsconflict; geen technische onzekerheden	beleidsconflict; technische onzekerheden
C. Praktische en economische haalbaarheid:		
Monitoringspunten buiten terreingrens	onbeperkte bereikbaarheid	beperkte of geen bereikbaarheid
Financiële aspecten	lange-termijn, juridisch bindende budgetten beschikbaar	geen lange-termijn budgetten voorzien (bij falende sanering)

* Aangetoond via haalbaarheidsonderzoek (zie volgende paragraaf)

4.2 Haalbaarheidsonderzoek

Onder haalbaarheidsonderzoek worden laboratoriumtesten en/of veldtesten verstaan waarbij op kleine schaal wordt uitgetest of de bioremediatievariant waarvoor wordt geopteerd, haalbaar is en waarbij gegevens worden verzameld die nodig zijn voor het ontwerp van de uiteindelijke full-scale saneringswerkwijze.

Een haalbaarheidsonderzoek geeft een antwoord op de volgende vragen:

- is de verontreinigde bodem biologisch saneerbaar?
- wat zijn de optimale procescondities?
- hoe snel zal de reiniging verlopen (bij benadering)?
- wat zijn de haalbare restconcentraties van de polluenten (bij benadering)?
- welke potentieel toxische en/of slecht afbreekbare dochterproducten worden eventueel gevormd?
- wat is het effect van de toediening van nutriënten (stikstof en fosfor)?
- wat is het effect van inoculatie van de bodem met micro-organismen?
- wat is het effect van chemische additieven zoals detergenten, cosubstraten, …

De wijze waarop het haalbaarheidsonderzoek werd uitgevoerd en de resultaten ervan dienen te worden opgenomen in het bodemsaneringsproject.

4.2.1 Aërobe biodegradatietest

Met behulp van een *batchtest voor aërobe biodegradatie* kan men op een relatief eenvoudige wijze de haalbaarheid van aërobe biologische bodemsanering controleren en de optimale procescondities op voorhand bepalen.

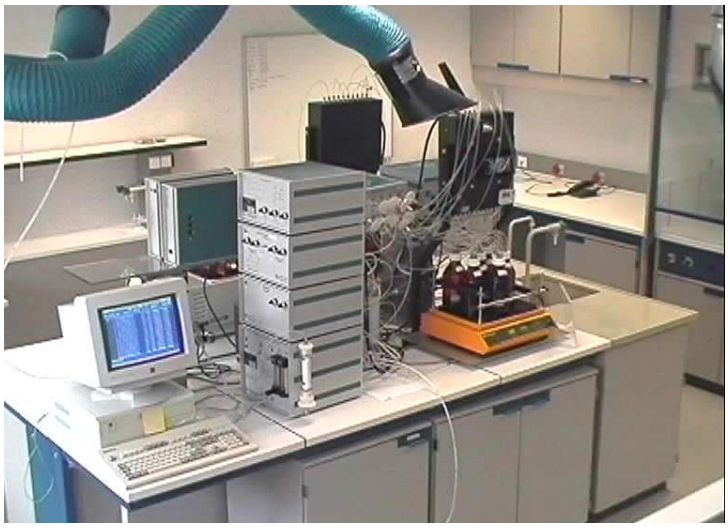
De verontreinigde grond en/of grondwater wordt biologisch behandeld door agitatie en beluchting als een waterige suspensie (slurrie). Onder deze optimale condities wordt een snellere afbraak van de vervuiling bekomen dan onder reële veldcondities. De bodem wordt voor en na behandeling (en eventueel tussentijds) geanalyseerd op het gehalte van de verontreiniging en op pH. De productie van kooldioxide en het verbruik van zuurstof ten gevolge van biologische oxidatie wordt gedurende de behandeling op regelmatige tijdstippen gemeten. Op het uitgangsmateriaal worden naast koolwaterstofanalyses ook metingen verricht van pH en asrest, optioneel kunnen stikstof, fosfaat, granulometrie en kiemgetal worden bepaald. Elke test wordt uitgevoerd met een abiotische controleproef en elke conditie wordt doorgaans in meervoud opgezet. De biologische afbraak wordt gerelateerd t.o.v. de abiotische controle waarmee het onderscheid tussen biotische afbraak en sorptie (reversibel) kan worden gemaakt door het meenemen van een ‘dode controle’ .

Dit type testen staat toe een massabalans te maken en de kinetiek van de afbraak te bepalen onder optimale omstandigheden. Tevens kunnen allerlei combinaties van toeslagstoffen (bv biosurfactants, nutriënten, …) en/of microbiële enten worden uitgetest om zo doende de optimale condities vast te leggen voor de uiteindelijke full-scale toepassing. Dit soort testen is verder wenselijk om na te gaan welk eindresultaat (restpollutie) onder optimale omstandigheden kan worden behaald; dus voor een betrouwbare onderbouwing van voorop te stellen te behalen eindresultaat (saneringsdoelstelling; terugsaneerwaarden).

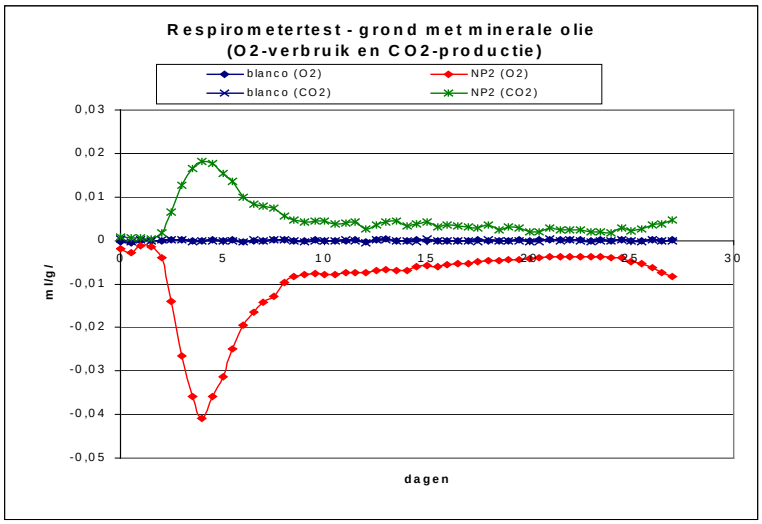
Een aërobe batchtest duurt standaard 6-8 weken, afhankelijk van de aard van de verontreiniging. Voor de proef is er een representatief grondstaal van ongeveer 2 kg nodig.

In het kader van dergelijke testen kunnen tevens eventuele ondersteunende analyses worden uitgevoerd zoals specifieke bacterietellingen, PCR (identificatie van specifieke bacteriën) en analyse van stabiele isotopen. Dit type van onderzoek is overigens optioneel en de noodzaak ervoor hangt af van de aard, omvang en de complexiteit van het bodemverontreinigingsprobleem.

Een variant op de aërobe batchtest is de z.g. *respirometertest* die niet wordt uitgevoerd in een hermetisch gesloten systeem maar met een gasflow doorheen de recipiënten waarin de bodemsuspensie zich bevindt (figuur 6). In de gasflow wordt continu het zuurstof- en koolzuurgasgehalte gemeten, zodat een indruk wordt verkregen van de respiratiesnelheid van de bacteriën (figuur 7). Zodra wordt vastgesteld dat de respiratie terugvalt, kan het restgehalte van de polluent worden bepaald. Omdat het systeem niet gesloten is, is de respirometertest enkel geschikt voor weinig vluchtige polluenten (PAK, zwaardere olietypes,…).



Figuur 6. Proefopstelling aërobe bioremediatietest met respirometer.



Figuur 7. Continue meting van zuurstof- en koolzuurgasconcentraties tijdens respirometertest.

4.2.2 Anaërobe batchtest

Onder bepaalde omstandigheden kan het wenselijk zijn te opteren voor een biodegradatievariant met een andere electronacceptor (dan zuurstof), zoals nitraat en/of sulfaat. Indien bij voorbeeld het bodemonderzoek heeft aangetoond dat er van nature anaërobe afbraak optreedt van de verontreiniging, maar dat daarbij mogelijk tekorten bestaan aan electronacceptors en/of nutriënten, dan kan een bioremediatievariant worden voorgesteld waarbij nitraat/sulfaat en/of nutriënten worden gedoseerd. De haalbaarheid en optimale condities kunnen voorafgaandelijk worden onderzocht met anaërobe batchtesten (microcosmostesten). Deze verlopen in principe op gelijkaardige wijze als aërobe batchtesten, maar in afwezigheid van zuurstof. Dit vergt speciale maatregelen tijdens bemonstering en transport van de representatieve grondstalen (onder stikstof), en tijdens het opzetten van de microcosms zelf (anaërobe kast). De microcosms zelf worden aangemaakt in flessen die hermetisch worden afgesloten. Deze hebben een rubberen septum waardoor desgewenst gasstalen kunnen worden genomen (headspace analyse op vluchtige polluenten). Voor niet-vluchtige polluenten wordt meestal destructief gewerkt: per meetmoment wordt een microcosmvial opgeofferd voor analyse. Er worden bij opstart van de test dan per testconditie net zoveel vials opgezet als nodig voor het voorziene aantal meetmomenten, met enkele extra vials als reserve.

Anaërobe laboratoriumtesten duren over het algemeen langer dan aërobe testen, omdat anaërobe afbraak meestal (veel) trager verloopt. Een richtwaarde voor de duur ervan is 3-12 maanden.

4.2.3 Laboratoriumtesten op grotere schaal

Een aantal biologische bodemsaneringsprocessen kunnen ook op een grotere schaal worden gesimuleerd dan in batch-slurrytesten.

Proeven kunnen uitgevoerd worden met een tiental kg vast bodemmateriaal voor simulatie van in-situ technieken zoals biorestauratie en bioventing en ex-situ technieken zoals landfarming. In dit type testen wordt doorgaans een RVS-container (inhoud: ca. 100 liter) gevuld met representatief verontreinigd bodemmateriaal dat met behulp van roterende schoepen wordt gemengd. Dergelijk systeem is volledig gesloten en toevoer van lucht, water, nutriënten en bacteriën doorgaans geautomatiseerd. Procesparameters zoals de temperatuur van de grond en de gehalten van zuurstof en kooldioxide in de gasfase worden continu geregistreerd en gestuurd via een PC. Vluchtige organische componenten in het afgas kunnen on-line geanalyseerd worden. Op regelmatige tijdstippen kunnen grondstalen uit de reactor worden genomen via een sluis waardoor het systeem gesloten blijft. Het bemonsteringsysteem en de grote capaciteit van de reactor maakt een groot aantal onafhankelijke staalnames mogelijk zonder significante beïnvloeding van de procescondities. Op basis van de analyses van grondstalen en afgas kan een massabalans opgesteld worden waarbij het aandeel van biodegradatie in de eventuele vermindering van de vervuilingsgraad effectief wordt aangetoond.

Een dergelijke haalbaarheidsonderzoek geeft een relatief snel antwoord op de volgende vragen:

- is de bodem biologisch saneerbaar?
- wat zijn de optimale procescondities?
- hoe snel zal de reiniging verlopen (bij benadering)?

- wat zijn de haalbare restconcentraties van de polluenten (bij benadering)?
- wat is het effect van de toediening van nutriënten (stikstof en fosfor)?
- wat is het effect van het inoculatie van de bodem met micro-organismen?
- wat is het effect van chemische additieven zoals detergenten, solventen, cosubstraten, ...

Het voordeel van een dergelijke test is de grotere schaal waardoor de resultaten respresentatiever zijn voor de latere full-scale toepassing.

4.2.4 Veldtesten: in-situ respiratietest

Voor dit type van haalbaarheidsonderzoek bestaan er verschillende mogelijke uitvoeringswijzen:

- Onverzadigde zone: **start-stop test** voor evaluatie van bioventing, in-situ & ex-situ
- Verzadigde zone: **start-stop test** voor de evaluatie van biosparging
- **Push-pull test** voor evaluatie van biosparging & bioremediëring

4.2.4.1 In-situ respiratietest in de onverzadigde zone

Een beperkte zone van de vervuilde ondergrond wordt gedurende korte tijd met lucht aangerijkt om aërobe condities te verzekeren. Vervolgens wordt de bodemlucht gedurende een aantal dagen onttrokken en geanalyseerd op kooldioxide en zuurstof om de respiratiesnelheid te bepalen (figuur 8). Dit wordt verwezenlijkt met een aantal filters dat wordt aangebracht in de onverzadigde zone van de bodem. Er wordt ook gebruik gemaakt van een referentieput die is aangebracht in een niet vervuilde zone van het terrein om de achtergrondrespiratie te bepalen die bv. kan toegeschreven worden aan de oxidatie van humus of gereduceerde anorganische stoffen. De geïnjecteerde lucht bevat een inert tracergas (He of SF_6) dat wordt gemeten in de onttrokken lucht om te controleren in welke mate een eventuele daling van het zuurstofgehalte te wijten kan zijn aan diffusie in plaats van biodegradatie. De gemeten respiratiesnelheden zijn een maat voor de haalbaarheid van bioventing. De gegevens kunnen worden omgerekend naar een afbraaksnelheid voor koolwaterstoffen die kan worden vergeleken met gepubliceerde waarden voor gelijkaardige verontreinigingen.

Figuur 8. Uitvoering van een in-situ respiratietest.

4.2.4.2 Push-pull-test voor de verzadigde zone

Bij de push-pull test wordt water dat is verzadigd met zuurstof in de aquifer geïnfiltreerd (push). Het water bevat een gekende concentratie van een onafbreekbare tracer zoals bromide-ionen. Er kunnen ook nutriënten en andere hulpmiddelen voor het stimuleren van biodegradatie toegevoegd worden aan het water. Vervolgens worden op regelmatige tijdstippen stalen van dit water uit de ondergrond gepompt (pull) en bovengronds geanalyseerd op de gehalten zuurstof en bromide. De meting van de bromideconcentratie geeft een idee over de mate van verdunning van het staal door diffusie en dispersie. Op basis van de meetgegevens wordt dan een respiratiesnelheid berekend.

4.2.4.3 Start-stop test voor de evaluatie van biosparging

Bij deze test wordt perslucht, eventueel samen met een tracergas zoals He of SF_6, geïnjecteerd in de aquifer door middel van een injectiefilter (start). Nadat de luchtinjectie werd stilgelegd (stop) wordt het grondwater periodiek opgepompt vanuit een monitoringput en geanalyseerd voor opgeloste zuurstof. In tegenstelling met de push-pull test wordt er in dit geval geen water in de bodem geïnfilteerd. Met een start-stop test bepaalt men de actuele respiratiesnelheid ten gevolge van biosparging, daar waar de push-pull test een respiratiesnelheid onder optimale omstandigheden van zuurstofvoorziening geeft. Beide testen kunnen worden gecombineerd om het sparging proces te optimaliseren. Het verschil in respiratiesnelheden zoals bepaald met beide testen is een indicatie voor de effectiviteit van air-sparging. De start-stop test kan ook worden gebruikt gedurende de fase van sanering om het biospargingproces te monitoren.

4.2.4.4 In-situ microcosmos test

Hierbij worden grondstalen genomen uit de verontreinigde zone en gekarakteriseerd op vervuiling en parameters die relevant zijn voor biodegradatie. De stalen worden na homogenisatie terug geplaatst in de verontreinigde bodem voor het monitoren van de biodegradatie. Zij kunnen worden geplaatst in doorlaatbare zakjes of in kolommen (in-situ kolomproef). De degradatieprocessen verlopen in dit geval onder reële veldomstandigheden. Op deze wijze omzeilt men het probleem van de heterogeniteit van de bodem, waardoor het nemen van goed vergelijkbare stalen op verschillende tijdstippen moeilijk is.

4.2.5 Checklist haalbaarheid bioremediatie door extractie/infiltratie

In tabel 8 is een checklist opgegeven die als hulpmiddel kan worden gehanteerd ter bepaling van de toepasbaarheid van extractie/infiltratie.

Tabel 8. Checklist haalbaarheid bioremediatie door extractie/infiltratie

Parameters	Bron	Ja/Neen
1. Factoren die bijdragen tot de permeabiliteit en doorspoelbaarheid van de bodem:		
1.1 de bodem is voldoende homogeen doorspoelbaar (de bodem is niet sterk gelaagd waarbij de bodemlagen een sterk onderling verschil vertonen in doorlaatbaarheid)	BBO	
1.2 De minimale hydraulische conductiviteit is 10^{-6} m/s (lemig zand).	BBO	
1.3 De bodem is vrij van natuurlijke of aangebrachte structuren die mogelijk de watercirculatie bemoeilijken of verhinderen (slecht-doorspoelbare zones).	BBO	
2. Randvoorwaarden biologische activiteit:		
2.1 de pH in de verontreinigde zone ligt tussen 6 en 8.	BBO	
2.2 er is aangetoonde biologische activiteit of er is aangetoond dat biologische activiteit activeerbaar is	BBO/haal-baarheids-onderzoek	
3. Eigenschappen van de polluenten:		
3.1 De polluenten zijn goed of voldoende biologisch afbreekbaar (aëroob en/of anaëroob)* en er worden geen schadelijke of slecht-afbreekbare tussenproducten gevormd	Literatuur	
3.2 De polluenten hebben een wateroplosbaarheid (S bij 25℃) > 0,1 g/L of voor minerale olie een grondgehalte < 10000 mg/kg of een C30-C40-gehalte < 1000 mg/kg ds	Literatuur en BBO	
3.3 Het hoofdaandeel van de vuilvracht komt niet voor als niet-doorspoelbare of slecht oplosbare puur-productfase†	BBO	
4. Garanties hydraulische controle:		
4.1 het ontwerp biedt voldoende garanties voor volledige hydraulische controle tijdens de uitvoering (geen risico's voor ongecontroleerde verspreiding van verontreiniging buiten de reeds verontreinigde zone)	BBO en evt. modellering	

BBO : Beschrijvend bodemonderzoek

Indien het antwoord op één of meerdere vragen neen is, dient meer informatie te worden ingewonnen om de haalbaarheid van de techniek na te gaan door het uitvoeren van een haalbaarheidsonderzoek.

---

* Voorbeelden van slecht afbreekbare petroleum koolwaterstoffen zijn: 4+-ring PAK, minerale olie C30-C40, cycloalkanen, bepaalde NSO-verbindingen

† indien aanzienlijke hoeveelheden puur product voorkomen of puur product voorkomt op niet goed doorspoelbare plaatsen kan bioremediatie door extractie/infiltratie nog toepasbaar zijn, maar is een afzonderlijke aanpak (verwijdering of isolatie) noodzakelijk van de genoemde puur-productzones

4.2.6 Checklist haalbaarheid bioventing/biosparging

In tabel 9 wordt een checklist gegeven die als leidraad kan worden gehanteerd bij de beoordeling van de toepasbaarheid bioventing en biosparging.

Tabel 9. Checklist van gegevens die beschikbaar moeten zijn om de toepasbaarheid van bioventing/biosparging te kunnen vaststellen

Parameters	Bron	Ja/Neen
1. Factoren die bijdragen tot permeabiliteit van de bodem:		
1.1 Er zijn er geen klei- of andere storende lagen aanwezig	BBO	
1.2 Het grondwater zit dieper dan 1 m-mv.	BBO	
1.3 De hydraulische conductiviteit > 10^{-7} m/s (leem).	BBO	
1.4 De bodem is vrij van structuren die mogelijk de luchtcirculatie bemoeilijken.	BBO	
1.5 Bodem pH tussen 6 en 8.	BBO	
2. Eigenschappen van de polluenten:		
2.1 De polluenten zijn aëroob biologisch afbreekbaar en er worden geen schadelijke (slecht-afbreekbare) tussenproducten gevormd.	Literatuur	
2.2 De concentratie aan minerale olie < 10000 ppm*.	BBO	
2.3 Het hoofdaandeel van de vuilvracht komt niet voor als weinig vluchtige of slecht oplosbare puur-productfase†	BBO	
3. Saneringsontwerp:		
3.1 het ontwerp biedt voldoende garanties voor volledige pneumatische en hydraulische controle tijdens de uitvoering (geen risico's voor ongecontroleerde verspreiding van verontreiniging buiten de reeds verontreinigde zone of naar de lucht)	BBO en evt. modellering	
3.2 werd een fase met bodemluchtextractie overwogen voor de bioventing fase?	-	

BBO : Beschrijvend bodemonderzoek

---

* De te halen restgehalten zijn afhankelijk van de samenstelling van de olie (en kan bv bepaald worden met een slurry biodegradatietest). De fractie C30-C40 zal niet of moeilijk afbreken. Als bv 10% van de olie C30-C40 is, dan is de haalbare terugsaneerwaarde in het beste geval 1000 mg/kg ds. Het maximaal gehalte waarvoor nog bioremediatie mogelijk is, is derhalve geen vaste waarde maar hangt af van de aard van de olie, de bodemheterogeniteit en de site-specifieke saneringsdoelstelling.

† indien aanzienlijke hoeveelheden puur product voorkomen of puur product voorkomt op niet goed luchtdoorspoelbare plaatsen kan bioventing/biosparging nog toepasbaar zijn, maar is een afzonderlijke aanpak (verwijdering of isolatie) noodzakelijk van de genoemde puur-productzones

Indien het antwoord op één of meerdere vragen neen is, dient meer informatie te worden ingewonnen om de haalbaarheid van de techniek na te gaan door het uitvoeren van een haalbaarheidsonderzoek.

4.3 Ontwerp full-scale bioremediatievariant

Na uitvoering van het (kleine-schaal) haalbaarheidsonderzoek dient een opschaling te gebeuren naar full-scale. Het full-scale ontwerp dient volledig in het bodemsaneringsproject te worden opgenomen. Daarin dient o.m. aan bod te komen:

- volledige en gedetailleerde technische beschrijving van de full-scale saneringsvoorzieningen en randvoorwaarden: (1) aantal en plaats infiltratie-/onttrekkingsvoorzieningen, aard en capaciteit pompen, compressoren, blowers, e.d. (2) debieten, (3) samenstelling van infiltratievloeistoffen en/of gassen (nutriënten, electronacceptors,…), voorziene injectieregimes en onderhoud,…
- onderbouwing van de verwachte full-scale saneringsduur en vooropgestelde objectieven; zijn deze redelijk in vergelijking met 'meer actieve' saneringsvarianten zoals ontgraving en off-site verwerking?
- zal de geïnduceerde bioremediatie blijven optreden of zijn er mogelijke beperkingen (vb. ophoping van dochterproducten, (bio)fouling, verzuring e.d.). Dit is vooral een kritische vraag bij aanwezigheid van een grote bron (hoge concentraties verontreinigingen, aanwezigheid puur product, groot volume: is de bioremediatie voldoende gedimensioneerd om in dit geval alle verontreiniging af te breken).

Deze evaluatie kan gebeuren op basis van massabalansen (globale reactievergelijkingen, die stoichiometrisch worden geïnterpreteerd (zie eerder in dit rapport).

Daarnaast dient de verspreidingssnelheid, rekening houdend met de vastgestelde bioremediatiesnelheid, te worden beoordeeld. De beoordeling hiervan kan gebeuren met behulp van een grondwaterstromingsmodel met stoftransportmodule. Door de vastgestelde afbraaksnelheid in het model te incorporeren (meestal wordt een eerste-orde afbraakmodel gehanteerd) kan men de verwachte evolutie van de verontreiniging tijdens de bioremediatie (en de eventuele dochterproducten) in beeld brengen. Een dergelijke modellering is met name aangewezen voor grote verontreinigingen.

Voor deze evaluatie dient men rekening te houden met de meest doorlatende lagen in de ondergrond. Deze kunnen soms zeer dun zijn, waarbij zeer grote verschillen optreden in hydraulische conductiviteit voor geringe variaties in diepte.

Bij de evaluatie van de pluimevolutie zal men rekening houden met de eventuele effecten van bronverwijdering en saneringsmaatregelen in het verleden. Verwijdering van de bron dient te worden uitgevoerd voor zover dit technisch en economisch mogelijk is.

Bioremediatie is een saneringswijze waarbij complexe processen optreden in de bodem. Na het haalbaarheidsonderzoek en tijdens het opstellen van het full-scale saneringsontwerp dient men een zeer goed begrip te hebben ontwikkeld over:

- hoe de verontreinigingstoestand (kern en pluim) is tot stand gekomen, met inbegrip van:

    - de driedimensionele verdeling van de oorsponkelijke bron en de aanwezige vuilvrachten
    - de beweging van het grondwater en dampfasen doorheen en weg van de bron
    - de verenigbaarheid van de actuele pluim met wat bekend is van de oorspronkelijke bron en de hydrogeologie van de site
- wat de snelheden zijn van verspreiding en verwachte afbraaksnelheden van de verontreinigingen
- wat de persistentie is van de vuilvracht (restconcentraties).

Het full scale ontwerp dient te worden opgenomen in het bodemsaneringsproject.

In het bodemsaneringsproject dient ook een gedetailleerd programma voor monitoring (zie *5.6 Operationele procesparameters bij de monitoring van bioremediatie*) te worden uitgewerkt, met inbegrip van een reservevariant en criteria voor inwerkingsstelling ervan. De reservevariant dient mee in overweging te worden genomen bij de BBT-afweging van de geselecteerde bioremediatievariant.

5 Opvolging van bioremediatie: principes

5.1 Inleiding

Onder ideale omstandigheden worden petroleumkoolwaterstoffen in de bodem volledig afgebroken tot onschadelijke stoffen zoals kooldioxide en water (aërobe afbraak) of methaan en kooldioxide (anaërobe afbraak). Gedurende het afbraakproces ontstaan metabolieten en nevenproducten die soms toxisch kunnen zijn. In een aantal gevallen blijft zelfs na langdurige behandeling een restverontreiniging aanwezig in de bodem. Dit komt voor wanneer de verontreiniging aanwezig is als een complex mengsel van stoffen waarvan sommige moeilijker of niet afbreekbaar zijn. Ook stoffen die in principe goed afbreekbaar zijn worden soms onvolledig verwijderd wanneer de biobeschikbaarheid ervan slecht is (onder andere door sterke sorptie aan humus of in de microporiën van bodemdeeltjes), alsook wanneer andere stoffen die beter afbreekbaar zijn in overmaat aanwezig zijn (dit is bijvoorbeeld het geval voor BTEX: zolang TEX in overmaat aanwezig zijn worden deze als preferentieel substraat afgebroken en is benzeen tijdelijk recalcitrant totdat alle TEX is opgebruikt).

Om het bioremediatieproces optimaal te kunnen laten verlopen of sturen is een *goede bewaking* (monitoring) van het proces noodzakelijk. Dit gebeurt in verschillende stadia van de sanering:

- veldkarakterisatie voorafgaand aan de sanering (opmeting ‘nulsituatie’ en haalbaarheidsonderzoek),
- monitoring gedurende de sanering,
- eindbeoordeling na afloop van de sanering.

Hierbij wordt vooral aandacht besteed aan:

- milieuparameters die het proces beïnvloeden
- bodemkwaliteitsparameters
- indicatieve parameters voor biodegradatie
- kwantitatieve parameters voor biodegradatie
- operationele procesparameters.

5.2 Milieuparameters

Deze omvatten vooreerst *geologische en hydrogeologische vastliggende parameters* zoals:

- het *humusgehalte* (koolstofbron, beperking van de biobeschikbaarheid door sorptie);
- *granulometrie en porositeit* (bepalend voor de doorlaatbaarheid voor water en lucht);
- *bodemprofiel*;
- *zuur/base buffercapaciteit* (aërobe biodegradatie verlaagt de pH),
- *ionenwisselingscapaciteit* (CEC/AEC, sorptie van nutriënten en metabolieten),
- *dispersie- en adsorptiecoëficiënten*
- *natuurlijke grondwaterstroming en waterpeil*.

Deze parameters worden bepaald voorafgaand aan de sanering in het kader van het haalbaarheidsonderzoek.

Een aantal parameters zijn *variabel in de tijd* en worden voorafgaand aan en gedurende de sanering gemeten:

- *pH* (deze is optimaal tussen 5 en 8),
- *redoxtoestand* (best aëroob voor petroleumkoolwaterstoffen),
- *gehalten aan nutriënten* (evolutie van C/N/P),
- *vochtgehalte* (voor onverzadigde zone, optimaal 50-60% van de veldcapaciteit),
- *bodemtemperatuur.*

5.3 Bodemkwaliteitparameters

Het verloop van het bioremediatieproces kan in eerste instantie gevolgd worden door het meten van de gehalten van de verontreinigingen in de bodem waaruit de afbraaksnelheid kan worden afgeleid.

Deze parameter zal in alle stadia van de sanering worden opgevolgd (haalbaarheidsonderzoek, monitoring tijdens de sanering en eindbeoordeling).

In het geval van complexe verontreinigingen dient men na te gaan dat alle risicovolle stoffen effectief worden afgebroken (of irreversibel worden vastgelegd).

Ook dient men in bepaalde gevallen aan te tonen dat er geen toxische metabolieten of nevenproducten accumuleren. Dit kan men bijvoorbeeld doen met behulp van toxiciteitsmetingen (*Microtox*, *Vitotox)* en bioassays (van der Waarde, J.J. et al., 1998).

De concentraties van verontreinigingen kunnen ook wijzigen onder invloed van fysische processen die niet gerelateerd zijn aan biodegradatie (vervluchtiging, dispersie in grondwater, sorptie aan aquifermateriaal). Daarnaast kunnen de concentraties in bodem- of grondwaterstalen sterk wijzigen naargelang de plaats (door de heterogeniteit van de bodem) of het tijdstip van staalname (verdunning door neerslag, tijdelijke wijzigingen in grondwaterstroming). Een daling van de concentraties van verontreinigingen is daarom niet noodzakelijk te wijten aan biodegradatie. Het is dan ook aangewezen om het biodegradatieproces op te volgen door het volgen van parameters die specifiek verbonden zijn met de microbiële activiteit (Madsen, 1991; Höhener et al., 1998). Deze omvatten zowel indicatieve als kwantitatieve parameters.

5.4 Indicatieve parameters voor biodegradatie

Deze tonen aan dat biodegradatie beter of trager verloopt in functie van de tijd. Zij omvatten onder andere:

- bacterietellingen
- microbieel moleculair materiaal (DNA, RNA)
- enzymactiviteit (dehydrogenase, esterase)
- isotopenverhouding $^{12}C/^{13}C$ in de verontreiniging of afbraakproducten daarvan
- biomerkers (n-C18/phytaan/pristaan, koolwaterstof/hopaan).
- vorming van metabolieten

- kooldioxide en alkaliniteit.
- geochemische indicatoren

Deze parameters zullen tijdens het haalbaarheidsonderzoek en tijdens de opvolging van de sanering van belang zijn.

Dit hoofdstuk wordt geïllustreerd aan de hand van een case studie in appendix 1.

5.4.1 Bacterietellingen

Deze omvatten de bepaling van het totaal kiemgetal door kweek op een niet selectief groeimedium (rijk milieu) of van specifieke populaties die kunnen groeien op een milieu dat de verontreiniging als enige koolstofbron bevat. Men kan ook directe microscopische tellingen uitvoeren door toediening van een kleurstof die de levende bacteriën selectief kleurt (b.v. acridine-oranje). Directe tellingen geven meestal hogere resultaten dan bepaling van het kiemgetal door groei op een medium waarbij enkel op het medium cultiveerbare bacteriën worden geteld. In sommige gevallen kunnen bacteriën niet op een groeimedium aangetoond worden omdat dit b.v. te “rijk” is (oligotrofe bacteriën). Het blijkt dat slechts enkele procenten van de microbiële populatie kunnen gecultiveerd worden in het laboratorium. De bepaling van het microbieel kiemgetal geeft dus een onderschatting van het totale microbiële populatie.

Door het uitvoeren van kiemtellingen kan men op voorhand een idee krijgen of microbiële afbraak kansrijk is voor een verontreiniging waarvan bekend is dat ze vlot biodegradeerbaar is. Zij geven ook een idee over mogelijke inhibitie van afbraak door toxiciteit. Wanneer de biologische activiteit gedurende een bioremediatieproces wordt gestimuleerd, wordt verwacht dat het specifiek kiemgetal gedurende het proces zal toenemen in verhouding tot het totaal kiemgetal. Men kan ook het kiemgetal monitoren van secundaire populaties, zoals protozoa die zich met bacteriën voeden.

5.4.2 Erfelijk materiaal

Bacteriën maken gebruik van erfelijk materiaal (DNA, RNA) voor de synthese van enzymen die worden gebruikt bij de afbraak van verontreinigingen. Dit materiaal is zeer specifiek voor deze enzymen en door het meten van DNA of RNA in bodemstalen kan men aantonen dat specifieke populaties in de bodem aanwezig zijn die in principe in staat moeten zijn om de vervuiling af te breken.

Het meten kan op zeer gevoelige wijze gebeuren door middel van de PCR-techniek (Polymerase Chain Reaction) waarbij sporen van erfelijk materiaal worden vermeerderd tot makkelijk meetbare hoeveelheden. Een aantal veel gebruikte bepalingen zijn deze van 16sRNA en DNA-sequenties voor catabolische enzymes zoals mono- en dioxygenases (o.a. verantwoordelijk voor oxidatie van BTEX en alkanen). Door het meten van mRNA (boodschapper-RNA) kan men specifieke microbiële activiteit in de bodem meten.

Met de DGGE-techniek (differential gradient gel electrophoresis) kan men wijzigingen in bacteriële populaties gedurende het saneringsproces volgen.

5.4.3 Fosfolipiden

Deze maken een belangrijk deel uit van de microbiële celwand. Zij kunnen relatief gemakkelijk en snel uit de bodem worden geëxtraheerd en gekwantificeerd door chemische analyse. Het gehalte fosfolipiden is een maat voor de totale actieve biomassa en de samenstelling ervan is ook indicatief voor de soort van bacteriënpopulatie die aanwezig is. De schatting van de biomassa is onafhankelijk van problemen met groei van bacteriën in het labo.

5.4.4 ATP

Bij de afbraak van verontreinigingen en andere koolstofbronnen produceren bacteriën ATP *(adenosine trifosfaat)* voor de opslag van de energie die vrijkomt bij het afbraakproces. ATP kan snel en op een relatief eenvoudige wijze gemeten worden in de bodem. Het is een maat voor de microbiële activiteit in de bodem.

5.4.5 Enzymatische activiteit

Men kan de microbiële activiteit relatief snel evalueren door het meten van de enzymatische activiteit. Bij de afbraak van verontreiniging maken de bacteriën gebruik van specifieke enzymes. Door het meten van de activiteit van enzymes die een rol spelen in de oxidatie van organisch materiaal verkrijgt men een indicatie van mogelijke afbraakactiviteit voor verontreinigingen. Voor deze toepassing bestaat er ervaring met vooral dehydrogenase en esterase enzymen.

5.4.6 Analyse van stabiele koolstofisotopen ($^{12}C/^{13}C$)

Koolstof-13 is een stabiele isotoop die ongeveer 1,1% van alle aanwezige koolstof uitmaakt. Het gehalte ^{13}C wordt uitgedrukt als $\delta^{13}C$ (“koolstofisotopenshift”), een maat die het ^{13}C-gehalte weergeeft ten opzichte van een internationale standaard (Pedee belemniet). Aan de hand van een analyse van de verhouding van de stabiele koolstofisotopen ^{12}C en ^{13}C in de restverontreiniging, in het gevormde CO_2 en eventueel in methaan in de bodem kan men biodegradatie aantonen en zelfs kwantificeren (Van de Velde et al., 1995). Deze analyse gebeurt relatief eenvoudig en goedkoop met behulp van isotopen massaspectrometrie. Ook andere isotopen kunnen worden gevolgd (bv. $^{1}H/^{2}H$).

5.4.6.1 Isotopenschift in TIC/CO_2

Microbiële afbraak van koolwaterstoffen met vorming van anorganische koolstof (TIC: total inorganic carbon) veroorzaakt een verschuiving van de isotopenverhoudingen van deze producten. Olieproducten hebben een $\delta^{13}C$ van ongeveer –29,7. Bij aërobe biodegradatie treedt een beperkte wijziging op van $\delta^{13}C$ in de geproduceerde CO_2, die dus een isotopenshift heeft gelijkaardig aan die van het uitgangsmateriaal. De $\delta^{13}C$ van kooldioxide van atmosferische oorsprong is ongeveer –10 tot –12, deze afkomstig van het oplossen van kalk ongeveer +0,7.

Door het accumuleren van CO_2 afkomstig van biologische afbraak van olieproducten zal er dus een negatieve verschuiving optreden van $\delta^{13}C$ van de anorganische opgeloste koolstof. Men kan de evolutie van de koolstofisotopenverhouding in kooldioxide gebruiken om na te gaan wanneer de biologische afbraak van de verontreiniging stagneert. In dit geval zal de isotopenverhouding evolueren naar deze van CO_2 in de niet verontreinigde achtergrond.

Bij anaërobe biodegradatie onder methanogene omstandigheden wordt echter een toename van $\delta^{13}C$ waargenomen (+48). Omdat aërobe en anaërobe afbraakprocessen een tegengestelde verschuiving veroorzaken dient men voorzichtig te zijn met de interpretatie van gegevens van isotopenanalyse wanneer deze processen simultaan voorkomen.

5.4.6.2 Isotopenschift van de polluent

Tengevolge van biodegradatie zal ook de $\delta^{13}C$ van de restverontreiniging veranderen: micro-organismen 'verkiezen' ^{12}C t.o.v. ^{13}C zodat de isotopenshift tijdens de afbraak toeneemt (of minder negatief wordt). Recent beschikt men over methoden met voldoende gevoeligheid om op basis van de metingen van de isotopenverhouding zelfs kwantitatief biodegradatie vast te stellen. Chemische omzettingen van de polluenten of fysische verschijnselen zoals adsorptie, verdunning e.d. veroorzaken geen isotopenshift zodat de vaststelling van een verschuiving een onomstotelijk bewijs vormt voor het optreden van biodegradatie.

Ook kan met behulp van isotopenshifmetingen worden achterhaald welke terminale electronacceptor optreedt bij de afbraak, b.v. $\delta^{34}S$ in het geval van sulfaatreductie: indien sulfaat optreedt als electronacceptor zal de resterende sulfaat in oplossing, aangerijkt worden met de zwaardere ^{34}S zwavelisotoop (Spence et al., 2001).

5.4.7 Biomerkers

Sommige stoffen die voorkomen in verontreinigingen zoals ruwe olie, benzine of minerale olie zijn relatief moeilijk afbreekbaar. Door het volgen van hun concentratie in functie van de tijd en in verhouding tot andere verontreinigingen kan het verloop van de bioremediatie worden gevolgd. Enkele stoffen die hiervoor worden gebruikt zijn:

- hopanen (C_{27}-C_{30} alicyclische koolwaterstoffen waaronder het triterpeen $C_{30}17\alpha(H)21\beta(H)$-hopaan);
- vanadium in ruwe olie;
- n-C_{18}/fytaan/pristaan in minerale olie;
- MTBE in benzine;
- verhouding trimethylbenzenen/BTEX in benzine.

Bij de biologische afbraak van minerale olie kan men in een GC-chromatogram een verschuiving waarnemen van de fracties volgens ketenlengte, waarbij het aandeel van de zwaardere ketens relatief zal toenemen in de tijd. Dit kan ook worden gebruikt als indicator voor biodegradatie. Het is daarom aangewezen om bioremediatieprocessen voor verontreiniging met minerale olie op te volgen aan de hand van GC-analyse. Een gelijkaardige verschuiving doet zich voor bij afbraak van PAK's, waarbij het relatief aandeel van stoffen met een groter aantal ringen zal toenemen naarmate de afbraak vordert.

5.4.8 Metabolieten

De biologische afbraak van verontreinigingen kan worden aangetoond door het meten van tussenproducten van biodegradatie. Voor BTEX-afbraak zijn de voornaamste tussenproducten fenolen en benzoëzuur. De belangrijkste intermediairen bij de afbraak van alkanen zijn carbonzuren, ketonen, aldehyden en alcoholen. De analyse van vluchtige vetzuren met GC/MS is ook al gebruikt voor het aantonen van biodegradatie (Wiedemeier et al, 1995; Code van goede praktijk:

Natuurlijke attenuatie). De bodemstalen worden vergeleken met een standaardmengsel dat fenolen, alifatische en aromatische vetzuren bevat. Bovenstaande analysen zijn niet eenvoudig en worden niet routinematig gebruikt. Het meten van het gehalte opgeloste organische koolstof in het grondwater (DOC) kan gebruikt worden als groepsparameter voor het meten van metabolieten die anders niet worden waargenomen in standaard analysepakketten.

5.4.9 Verzadigd/aromatisch/polair verhouding

Onder invloed van biodegradatie worden overwegend apolaire petroleum koolwaterstoffen in eerste instantie geoxideerd tot polaire tussenproducten zoals organische zuren, ketonen, aldehyden en fenolen. Deze worden ultiem omgezet tot kooldioxide. Gedurende een biodegradatieproces zal de verhouding polaire/apolaire koolwaterstoffen dus (tijdelijk) toenemen. Door het meten van koolwaterstoffen in grond(water)stalen met en zonder chemische opwerking voor verwijdering van polaire stoffen (bvb alumina, florisyl) krijgt men een idee over deze verschuiving.

5.4.10 Alkaliniteit en geleidbaarheid van het grondwater

Als gevolg van biodegradatie worden koolwaterstoffen geoxideerd tot ondermeer organische zuren en kooldioxide. Kooldioxide wordt via het koolzuurevenwicht omgezet in koolzuur, bicarbonaat en carbonaat, waardoor de alkaliniteit verhoogt:

$$\mathbf{CO_2 + H_2O <==> H_2CO_3 <==> H^+ + HCO_3^- <==> H^+ + CO_3^{2-}}$$

Onder invloed van de zure werking van koolzuur en ook van de intermediaire organische zuren zal ook de in de bodem aanwezige kalk (carbonaten) in oplossing gaan, met als gevolg een verhoging van de alkaliniteit van het grondwater.

De bovenstaande processen zorgen naast een verhoging van de alkaliniteit ook voor een toename van de specifieke elektrische geleidbaarheid van het grondwater.

5.4.11 Temperatuurverhoging

Biologische oxidatie van koolwaterstoffen is een exotherme reactie die warmte genereert. Hierdoor kan de bodemtemperatuur toenemen. Het volgen van de temperatuur kan een indicatie geven van de intensiteit van biodegradatie (bvb in biobedden voor ex-situ bioremediatie).

5.4.12 Geochemische indicatoren

Verlaagde gehalten van elektronacceptoren (zuurstof, nitraat, sulfaat) of verhoogde gehalten van gereduceerde elektronacceptoren (nitriet, Mn^{2+}, Fe^{2+}, H_2S, CH_4) zijn een indirect bewijs van het optreden van biodegradatie. Zelfs bij toevoer van zuurstof of nitraat voor stimulering van de biologische afbraak kunnen alternatieve elektronacceptoren worden gebruikt in zones waar zuurstof of nitraat onvoldoende aanwezig zijn. Vooral in geval van toediening van nitraat als elektronacceptor dient men nitriet op te nemen in het monitoringprogramma omdat dit als toxisch tussenproduct kan accumuleren.

5.5 Kwantitatieve parameters voor biodegradatie

Hieronder verstaat men de parameters die een idee verschaffen over de graad van microbiële activiteit op een bepaald ogenblik.

De volgende metingen kunnen worden gebruikt tijdens de full-scale uitvoering van de bioremediatie:

- in-situ respiratiemeting voor aërobe bioremediatie;
- consumptiesnelheid van alternatieve elektronacceptoren zoals nitraat en sulfaat en productiesnelheid van gereduceerde verbindingen zoals zwavelwaterstof/sulfiden voor anaërobe bioremediatie.

5.5.1 In-situ respiratietesten

Dit type test dat reeds werd besproken in hoofdstuk 4 bij het voorafgaandelijk haalbaarheidsonderzoek, kan ook op verschillende tijdsstippen plaatsvinden tijdens de full-scale uitvoering van een bioremediatieproject. Voor de verdere uitvoeringswijzen wordt verwezen naar hoofdstuk 4.

5.5.2 In-situ mesocosm test

Hierbij worden grondstalen genomen uit de verontreinigde zone en gekarakteriseerd op vervuiling en parameters die relevant zijn voor biodegradatie. De stalen worden na homogenisatie terug geplaatst in de verontreinigde bodem voor het monitoren van de effectiviteit van de (full-scale) bioremediatie. De mesocosms kunnen worden geplaatst in doorlaatbare zakjes of in kolommen (in-situ kolomproef). De degradatieprocessen verlopen in dit geval onder reële veldomstandigheden. Op deze wijze omzeilt men het probleem van de heterogeniteit van de bodem, waardoor het nemen van goed vergelijkbare stalen op verschillende tijdstippen moeilijk is. Deze werkwijze werd toegepast op één van de voorbeeldlocaties in bijlage.

5.5.3 Snelheid van respiratie van alternatieve elektronacceptoren en vorming van metabolieten

Het meten van deze stoffen over een relatief korte tijdspanne is niet zo eenvoudig als aërobe respiratiemetingen omdat de anaërobe processen aanzienlijk trager verlopen (ruwweg een factor 10) zodat meetfouten door diffusie groter kunnen worden. In principe zijn testen zoals de push-pull test geschikt voor deze metingen, maar er is nog weinig ervaring mee in de praktijk.

5.6 Operationele procesparameters bij de monitoring van bioremediatie

5.6.1 Inleiding

Proces performantie monitoring gebeurt op intensieve wijze in de beginfase van een bodemsaneringswerk of na ingrijpende wijzigingen in het saneringsconcept. Nadien wordt deze periodiek uitgevoerd.

Het meten van de operationele procesparameters wordt uitgevoerd om na te gaan of het technisch proces op een stabiele manier voldoet aan de ontwerpvereisten. Dit monitoren van de performantie van bioremediatie is intensiever dan het monitoren van de saneringsdoelstellingen (concentraties van verontreinigingen) op zich.

In de volgende paragrafen wordt een overzicht gegeven van de parameters die relevant zijn voor de belangrijkste in-situ bioremediatieprocessen.

5.6.2 Biorestauratie door infiltratie

De performantiemonitoring bij bioremediatie door infiltratie is erop gericht:

- De verspreiding van de hulpstoffen in de ondergrond voor de evaluatie van de beheersbaarheid en de doeltreffendheid van de infiltratie na te gaan. Hiervoor kan men gebruik maken van conservatieve tracers zoals bromide (b.v.. toegediend in pulsen) en van chloride (b.v.continu toegediend);
- De gehalten van elektronacceptoren (oxidantia) zoals opgeloste zuurstof (optimaal bij een concentratie groter dan 2 mg/l) of nitraat in het grondwater op te volgen. Opgeloste zuurstof kan in het veld worden gemeten met een zuurstofelektrode (onnauwkeurig bij zuurstofconcentraties < 1 mg/l) of in het labo volgens de Winkler-methode. Nitraat of sulfaat wordt best in het labo gemeten met ionenchromatografie (OVAM afvalstoffencompendium);
- De evolutie van de gehalten van nutriënten in de bodem of het grondwater op te volgen (optimale omstandigheden worden doorgaans bereikt bij N > 5 mg/l, P > 0,5 mg/l en C/N/P = 100/10/1);
- Nagaan of er geen verstopping optreedt van de injectieputten en extractieputten door biomassa (bacteriënslijm), door anorganische neerslagen ($Fe(OH)_3$; MnO_2 aardalkalineerslagen of aluminiumhydroxide), door ijzer- en mangaansulfiden ten gevolge van de activiteit van sulfaatreducerende bacteriën, door minerale deeltjes (colloïden of fijn zand) of door opgehoopte gasbellen (voor retourputten). Dit kan gebeuren rond de filter, maar ook rond de boorgatwand en kan worden vastgesteld aan de hand van debietmetingen en visuele inspectie. Het verstoppingsrisico dat wordt veroorzaakt door colloïdale deeltjes kan worden bepaald door de membraanfiltratie-index (MFI; van Beek, 1998). De bepaling van methaan- en stikstofconcentraties in het onttrokken grondwater kan een indicatie geven van het verstoppingsgevaar door gasbelvorming;
- Nagaan of geen verstopping van de aquifer optreedt. Dit is mogelijk door overmatige aangroei van biomassa, door colloïdaal materiaal, door chemische neerslagen (bvb van fosfaten of ijzer) of door kleizwelling

(veroorzaakt door de veranderde samenstelling van het retourwater). Deze processen kunnen worden bewaakt door het uitvoeren van een doorlatendheidsbepaling (slugtest, pompproef, tracertest, in-situ-debietmeter, …);

- Opvolgen van de werking en zuiveringsrendementen van de GWZI door het meten van concentraties van verontreinigingen in influent en effluent.

Een checklist voor opvolging van een bioremediatievariant door infiltratie is gegeven in tabel 10. De CGP 'Pump & Treat' (www.ovam.be) bevat tevens een overzicht van de aandachtspunten bij (her)infiltratie (par. 2.5.4 op p.28 e.v.; p.39: tabel 9 en p61/62).

Tabel 10. checklist voor opvolging van bioremediatie d.m.v. extractie en (her)infiltratie

Parameter	Frequentie *	Meetmethode
1. debiet per filter/drain voor injectie en extractie	Wekelijks (start), later maandelijks	Debietmeters op installatie
2. druk per filter/drain voor injectie	Tijdens pilootfase en intensief tijdens startfase, later wekelijks/maandelijks	Drukmeters op installatie
3. parameters indicatief voor verstoppingsgevaar (zie CGP P&T) in influent	Wekelijks initieel; later maandelijks tot 3-maandelijks	Analyse
4. Aantal draaiuren van de installatie	Continu	Tijdsregistratie meter op installatie
5. hoeveelheid geïnjecteerd en geëxtraheerd water per periode, per filter/drain en totaal	Maandelijks tot 3-maandelijks	Berekening uit debiet- en tijdregistratie
6. hoeveelheid geïnjecteerde hulpstoffen (nutriënten, electronacceptors, bacteriën, …) en geëxtraheerd water per periode, per filter/drain en totaal	3-maandelijks	Berekening
7. Invloedszone injectie/extractie	Dagelijks/wekelijks gedurende startfase; later maandelijks tot 3-maandelijks	Tracer analyse, interpolatie grondwaterverhang, modellering
8. Concentraties polluenten en veldparameters (pH, EC, T, O2) in influent en infiltratiewater	Dagelijks/wekelijks gedurende startfase; later maandelijks tot 3-maandelijks	Analyse
9. Bioremediatieparameters in influent (nutriënten, DOC/DIC, afbraakparameters, bacterietellingen,…)	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Analyse
10. Grondwaterstanden en veldparameters (pH, EC, T, O2) in monitoringsfilters	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Grondwaterstandsmeter en electrodes
11. pollutie- en biologische parameters in monitoringsfilters	Eerste 3 maanden: maandelijks Vervolgens: 3-maandelijks	Analyse
12. Vuilvrachtverwijdering door extractie	Bij iedere influentanalyse	berekening
13. pollutieparameters en nutriënten in vaste bodemfase (indien relevant)	3 tot 6-maandelijks	Representatieve staalname (boringen met mengmonsters en/of mesocosms) en analyse
14. Evaluatie van het biologisch afbraakrendement in de waterfase	Bij iedere influentanalyse	Berekening op basis van afname polluentconcentraties t.o.v. conservatieve tracer
15. Evaluatie van het biologisch afbraakrendement in de vaste fase	Bij iedere analyse van de vaste bodemfase	Berekening op basis van afname polluentconcentraties t.o.v. initiële toestand
16. Opvolging van de WZI	Zoals voor Pump&Treat	

* Indicatief; beargumenteerde afwijkingen zijn mogelijk

5.6.3 Bioventing

De performantiemonitoring bij bioremediatie middels bioventing verloopt in feite zoals voor 'gewone' bodemluchtextractie (cfr. Code van goede praktijk: bodemluchtextractie en persluchtinjectie). Onder andere dienen volgende aspecten te worden opgevolgd:

- *Aantal draaiuren van de installatie* (continue opvolging). Zij geeft informatie omtrent de werking van de installatie en laat ook toe om de evolutie van de vracht te berekenen van vluchtige koolwaterstoffen die eventueel worden verwijderd via een bodemluchtextractiesysteem;

- *Extractie(injectie)debieten en drukken*. Deze parameters worden best continu gemeten ter controle van de werking van de blower of compressor. De meting gebeurt ter hoogte van het injectiesysteem. Het is aangewezen om ook de luchtdebieten te meten van individuele filters om een optimaal rendement van het gehele systeem te verzekeren. Wijzigingen van het debiet in de tijd kunnen wijzen op lekken of vorming van preferentiële kanalen of verstopping;

- *Invloedstraal per luchtextractie(injectie)filter*. Dit is de zone waarin het zuurstofgehalte is verhoogd tot de minimaal vereiste waarde. Dit kan worden gemeten door middel van omringende extractiefilters of met speciaal hiertoe aangebrachte monitoringfilters (b.v. voor permeabiliteitstesten). Het is aangewezen om deze meting periodiek uit te voeren gedurende de sanering om na te gaan of de invloedsfeer niet is gewijzigd en dat kortsluiting of mechanische storingen niet optreden;

- *Gehalten en verdeling van zuurstof en kooldioxide in de onverzadigde zone*. Het zuurstofgehalte in de onverzadigde zone is optimaal indien groter dan 5%. Men kan een globaal beeld krijgen van deze parameters door het meten ervan in de lucht die de blower verlaat of in de lucht ter hoogte van individuele onttrekkingsfilters. Voor het evalueren van de effectieve verdeling in de ondergrond kan men ook in-situ metingen verrichten, b.v. met permanente in-situ sensoren voor zuurstof;

- *Vochtgehalte in de onverzadigde zone*. Zoals hoger vermeld is een gehalte van 50-60% van de veldcapaciteit optimaal voor bioremediatie. Het vochtgehalte kan dalen onder invloed van bioventing doordat het bodemvocht met de spoellucht wordt afgevoerd;

- *Werking en zuiveringsrendementen van de luchtzuivering*. De zuiveringsrendementen kunnen worden bepaald door analyse van influent en effluent van de luchtzuivering. Dit kan voor somparameters gebeuren met een FID-meter (vooral voor vluchtige alkanen) of met een PID-meter (vooral voor BTEX). Men kan ook specifieke stoffen meten met Dräger-sorptiepatronen of met een draagbare gaschromatograaf, of door analyse van een gasmonster in het labo;

- *Concentraties van verontreinigingen in de omgevingslucht*. Indien men gebruik maakt van injectie van lucht zonder luchtextractiesysteem, dan kunnen vluchtige verontreinigingen uit de onverzadigde bodem worden geblazen. Dit leidt tot probleemverschuiving en mogelijke risico's voor

blootstelling en explosie. Het is in dit geval aangewezen om, vooral bij de aanvang van de sanering, concentraties van vluchtige koolwaterstoffen te meten ter hoogte van het maaiveld of in aanpalende gesloten ruimten.

5.6.4 Biosparging

De performantiemonitoring bij bioremediatie middels biosparging verloopt in feite zoals voor 'gewone' persluchtinjectie (cfr. Code van goede praktijk: bodemluchtextractie en persluchtinjectie). Onder andere dienen volgende aspecten te worden opgevolgd:

- *Het aantal draaiuren van de compressor, het injectiedebiet en de injectiedruk*. Deze worden gemeten ter controle van de werking van de installatie. Het is aangewezen om druk en luchtdebieten te meten van individuele filters om een optimaal rendement van het gehele systeem te verzekeren. Een te sterk oplopende druk kan veroorzaakt zijn door verstopping of door een ophoping van lucht onder een weinig doorlatende laag;

- *Gehalten en verdeling van opgeloste zuurstof in de het grondwater*. Het zuurstofgehalte in het grondwater is optimaal voor aërobe biodegradatie indien groter dan 2 mg/l;

- *Invloedstraal per injectiefilter*, b.v. aan de hand van het gehalte opgeloste zuurstof in functie van de afstand tot het injectiepunt of aan de hand van metingen van de verspreiding van een inert tracergas zoals helium of SF6;

- *Mogelijke verstopping van injectiefilters*. Zie biorestauratie door infiltratie;

- *Horizontale verspreiding van de lucht en verontreinigingen in het grondwater* om na te gaan of er geen ongecontroleerde verspreiding optreedt in de aquifer;

- *Captatie van gestripte verontreinigingen in de onverzadigde zone* om na te gaan of er geen ongecontroleerde verspreiding optreedt via de bodemlucht. Dit kan ondermeer gebeuren door middel van de injectie van conservatieve tracers zoals helium of zwavelhexafluoride, waarbij men de recuperatie ervan nagaat door analyse van de lucht die wordt onttrokken via bodemluchtextractiefilters in de onverzadigde zone rondom de injectiefilter;

- *Werking en zuiveringsrendementen van de luchtzuivering*. Zie bioventing.

Tabel 11 en Tabel 12 geven een checklist voor de opvolging van respectievelijk biosparging en bioventing. Ze zijn ontleend aan de Code van goede praktijk voor bodemluchtextractie en persluchtinjectie (www.ovam.be), met specifieke aanvullingen voor bioremediatie (naar Okx & Van Ree 1996).

Tabel 11 Checklist voor opvolging van bodemsanering met bioventing

Parameter	Frequentie	Meetmethode
1. Luchtdebiet per filter voor injectie of extractie	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Debietmeters op installatie
2. Onder/overdruk per filter voor injectie of extractie	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Drukmeters op installatie
3. Aantal draaiuren van de installatie	Continue	Urenmeter op compressor of blower
4. Concentraties verontreiniging in de onttrokken lucht per filter en totaal (+ berekening van de hoeveelheid totaal onttrokken vuilvracht per filter en totaal)	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	PID/multimeter Actievekoolbuisjes Drägerbuisjes
5. Schatting van de vuilvracht verwijderd via extractielucht per periode	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Σ (Concentratie per filter x debiet x periode)
6. Concentraties verontreiniging onttrokken cumulatief (vuilvracht) in relatie tot de geraamde hoeveelheid aanwezige vuilvracht.	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Berekenen op basis van de gegevens in punt 4 van deze tabel.
7. Grondwaterstand	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Grondwaterstandsmeter
8. Analyse influent en effluent luchtzuivering (+ inschatting van de benodigde hoeveelheid actieve kool)	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	PID/multimeter Actievekoolbuisjes Drägerbuisjes
9. Hoeveelheid afgevoerde actieve kool	Bij vervanging	Ladingsbons
10. Polluentconcentraties in de omgevingslucht	Maandelijks (aanvulling bij 4)	PID/actievekoolbuisjes
11. concentratie zuurstof en kooldioxide in de onttrokken bodemlucht	Maandelijks	Zuurstofmeter
12. concentratie zuurstof en kooldioxide in de bodemlucht ter hoogte van monitoringfilters	Maandelijks (O_2 > 5%)	Zuurstofmeter
13. druk in monitoringfilters rondom PLI of BLE	Opstart en nadien driemaandelijks	drukmeter
14. Biologische activiteit – verbruiksnelheid zuurstof in-situ (start-stop-test)	Opstart en nadien driemaandelijks	Zuurstofmetingen in onttrokken bodemlucht en in monitoringfilters tov propere referentiegrond
15. Gehalte vocht en pH in grondstalen (risico op uitdroging en verzuring)	Zelfde frequentie als analysen van grondstalen op verontreinigingen	Chemische analyse in labo
16. Gehalte nutriënten in grondstalen	Driemaandelijks	Chemische analyse in labo

Tabel 12 Checklist voor opvolging van bodemsanering met biosparging

Parameter	Frequentie	Meetmethode
1. Luchtdebiet per injectiefilter	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Debietmeters op installatie
2. Overdruk per filter voor injectie	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Drukmeters op installatie
3. Aantal draaiuren van de installatie	Continue	Urenmeter op compressor
4. Concentraties verontreiniging in de onttrokken lucht per filter en totaal (+ berekening van de hoeveelheid totaal onttrokken vuilvracht per filter en totaal)	Optioneel indien luchtextractie aanwezig Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	PID/multimeter Actievekoolbuisjes Drägerbuisjes
5. Schatting van de vuilvracht verwijderd via extractielucht per periode	Optioneel indien luchtextractie aanwezig Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Σ (Concentratie per filter x debiet x periode)
6. Concentraties verontreiniging onttrokken cumulatief (vuilvracht) in relatie tot de geraamde hoeveelheid aanwezige vuilvracht.	Optioneel indien luchtextractie aanwezig Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Berekenen op basis van de gegevens in punt 4 van deze tabel.
7. Grondwaterstand	Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	Grondwaterstandsmeter
8. Analyse influent en effluent luchtzuivering (+ inschatting van de benodigde hoeveelheid actieve kool)	Optioneel indien luchtextractie aanwezig Eerste 2 maanden: wekelijks Vervolgens: maandelijks	PID/multimeter Actievekoolbuisjes Drägerbuisjes
9. Hoeveelheid afgevoerde actieve kool	Optioneel indien luchtextractie aanwezig Bij vervanging	Ladingsbons
10. Polluentconcentraties in de omgevingslucht	Maandelijks (aanvulling bij 4)	PID/actievekoolbuisjes
11. concentratie zuurstof in grondwater voor bepaling invloedsgebied zuurstofaanrijking	Bij ingebruikstelling en nadien maandelijks (O_2 > 2-3 mg/L)	Meter voor opgeloste zuurstof via doorstroomcel; zuurstofdiver
12. concentratie zuurstof en kooldioxide in de bodemlucht ter hoogte van monitoringfilters	Maandelijks (O_2 > 5%)	Zuurstofmeter
13. druk in monitoringfilters rondom PLI voor bepaling invloedzone van luchtinjectie	Opstart en nadien driemaandelijks	Meting met drukmeter in bodemluchtfilters in onverzadigde zone
14. Biologische activiteit – verbruiksnelheid zuurstof in-situ (start-stop-test)	Opstart en nadien driemaandelijks	Zuurstofmetingen in grondwater in monitoringfilters tov propere referentiefilters
15. Gehalte nutriënten in grondwaterstalen	maandelijks N > 20 mg/L P > 0,5 mg/L	Chemische analyse in labo
16. Hydraulische conductiviteit voor bewaking van kwaliteit injectiefilter	3-6 maandelijks	Daling in tijd minder dan 50% van oorspronkelijke conductiviteit

5.6.5 Bioschermen

Voor de opvolging van de processen in biowanden kan in principe worden verwezen naar de opvolging die dient te gebeuren voor een 'vlekdekkende' bioremediatie, met dien verstande dat de monitoring zich afspeelt ter hoogte van de biowand en niet vlekdekkend.

Omdat een biowand is bedoeld als *beheersingsmaatregel* (verhinderen dat een grondwaterpluim zich verder verspreidt), dient de monitoring in de eerste plaats erop gericht te zijn aan te tonen dat de biowand in deze opzet slaagt. Globale richtlijnen voor de monitoring omvatten dus dat monitoringspeilbuizen stroomopwaarts, in en stroomafwaarts van de biowand of biologisch geactiveerde zone dienen te worden geplaatst die worden gevolgd op dezelfde parameters als in een vlek-dekkende bioremediatievariant.

Voor de keuze van het aantal monitoringspeilbuizen en hun plaats kan bv. worden verwezen naar de Code van goede praktijk – reactieve wanden (www.ovam.be) en tevens de codes van goede praktijk voor natuurlijke attenuatie en pump&treat.

5.6.6 Andere bioremediatievarianten

In voorliggend document zijn naast bodemspoelen, bioventing en biosparging nog enkele andere bioremediatievarianten globaal besproken (bioslurping en fytoremediatie). De opvolging wat betreft de optredende biodegradatieprocessen van een bioslurping bioremediatieproject is in feite volledig gelijklopend met deze van biosparging/bioventing. Voor wat betreft de opvolging van operationele parameters bij bioslurping kan worden verwezen naar de Code van goede praktijk – pump & treat.

Een afzonderlijke uitwerking van de vereiste monitoring voor fytoremediatieprojecten wordt in voorliggend document niet gegeven.

6 Literatuur

Acton, D. W. and J. F. Barker, 1992. Insitu Biodegradation Potential of Aromatic-Hydrocarbons in Anaerobic Groundwaters. *Journal of Contaminant Hydrology* 9(4): 325-352.

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation, 2nd Ed., Academic Press, 1999, 453 blz.

Anderson, R. T. and D. R. Lovley, 1999. Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-reducing conditions in petroleum-contaminated aquifers. *Bioremediation Journal* 3(2): 121-135.

Anderson, R. T., J. N. Rooney-Varga, et al., 1998. Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology* 32(9): 1222-1229.

Ball, H. A. and M. Reinhard, 1996. Monoaromatic hydrocarbon transformation under anaerobic conditions at Seal Beach, California: Laboratory studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(2): 114-122.

Ball, H. A., H. A. Johnson, et al., 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1*. J. Bacteriol*. 178(19): 5755-5761.

Barbaro *et al*., 1992. Biotransformation of BTEX under anaerobic denitrifying conditions: field and laboratory observations. *J. of Contaminant Hydrology*, 11, 245-272.

Bardos, P. 1996. A review of full scale treatment technologies for the remediation of contaminated soil. EPP Publications, Richmond, Surrey

Beller, H. R., W. H. Ding, et al., 1995. By-Products of Anaerobic Alkylbenzene Metabolism Useful as Indicators of in-Situ Bioremediation. *Environmental Science & Technology* 29(11): 2864-2870.

Bjerg, P. L., K. Rugge, et al., 1999. Degradation of aromatic and chlorinated aliphatic hydrocarbons in the anaerobic part of the Grindsted Landfill leachate plume: In situ microcosm and laboratory batch experiments. *Ground Water* 37(1): 113-121.

Borden, R.C., Gomez, C.A. & Becker, M.T., 1995. Geochemical indicators of natural attenuation. *Ground Water* 33 (2): 180-189.

Bundt, J. 1995. Mineralölanalytik von bodenkontaminationen, Handbuch der Altlastensanierung, GW2, 3533.

Cunningham JA, Hopkins GD, Lebron CA, Reinhard M, 2000. Enhanced anaerobic bioremediation of groundwater contaminated by fuel hydrocarbons at Seal Beach, California. Biodegradation 11: 159-170.

Cunningham JA, Rahme H, Hopkins GD, Lebron C, Reinhard M, 2001. Enhanced in situ bioremediation of BTEX contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. Environmental Science & Technology 35: 1663-1670

Davis, G. B., C. Barber, et al., 1999. The variability and intrinsic remediation of a BTEX plume in anaerobic sulphate-rich groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology* 36(3-4): 265-290.

Doelman, P. en Schraa, G., 1995. Knelpunten voor in-situ en on-site reiniging; oplossingen met grootschalige reactorsystemen.Iwaco bv, Nederland

Edwards, E. A. and D. Grbic-Galic, 1994. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol* 60: 313-322.

Edwards, E. A., L. E. Wills, et al., 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol* 58(3): 794-800.

Edwards, E.A., D. Grbic-Galic. 1992b Complete mineralisation of benzene by aquifer microorganisms unser strictly anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol*. 58: 2663-2666.

Elshahed, M. S., L. M. Gieg, et al., 2001. Signature metabolites attesting to the in situ attenuation of alkylbenzenes in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol*. 35: 682-689.

Evans, P. J., D. T. Mang, et al., 1991. Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* 57(2): 450-454.

Ficker, M., K. Krastel, et al., 1999. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5576-5585.

Flyvbjerg, J., E. Arvin, et al., 1993. Microbial-Degradation of Phenols and Aromatic-Hydrocarbons in Creosote-Contaminated Groundwater under Nitrate-Reducing Conditions. *Journal of Contaminant Hydrology* 12(1-2): 133-150.

Frankenberger W.T and Dick W.A. 1983. Relationships between enzyme-activities and microbial-growth and activity indexes in soil. *Soil Sci Soc Am J* 47: 945-951

Fries, M. R., J. Zhou, et al., 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl Environ Microbiol* 60(8): 2802-2810.

Gieg, L. M., R. V. Kolhatkar, et al., 1999. Intrinsic bioremediation of petroleum hydrocarbons in a gas condensate-contaminate aquifer. *Environmental Science & Technology* 33(15): 2550-2560.

Handboek Bodemsaneringstechnieken, 2001. Sdu Uitgeverij Koninginnegracht, Den Haag, (5 delen).

Haner, A., P. Hohener, et al., 1995. Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 61(8): 3185-3188.

Harms, G., K. Zengler, et al., 1999. Anaerobic Oxidation of o-Xylene, m-Xylene, and Homologous Alkylbenzenes by New Types of Sulfate-Reducing Bacteria. *Appl. Envir. Microbiol*. 65(3): 999-2150.

Heath, J.S. et al, 1993. Review of Chemical, Physical and Toxicological properties of components of Total Petroleum Hydrocarbons. *J. of Soil Contamination*, 2: 1-25.

Heitzer, A. and Sayler, G.S., 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation. Tibtech, august 1993 (vol 11), 334-343

Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Häner, D. Stx, P. Höhener, J.Zeyer. 1997. In situ analysis of denitrifying toluene- and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column.

Hinchee, R.E. and Ong, S.K., 1992. A rapid in situ respiration test for measuring aerobic biodegradation rates of hydrocarbons in soil. *J. Air & Waste Management Association* 42:1305-1312.

Hinchee; R.E., Douglas, G.S. and Ong, S.K., (Ed), 1995. Monitoring and Verification of Bioremediation; *Battelle Press, Colombus*

Höhener, P. et al.,1998. Methodology for the evaluation of engineered in-situ bioremediation: lessons from a case study. *J. of Microbiological Methods* 32: 179-192.

Ide G. en Ectors A. 1997. Bodemverontreiniging en bodemsanering. Handboeken Stichting Leefmilieu vzw, Antwerpen, 211 blz

ITRC, 1999. Phytoremediation Decision Tree. *Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group -Phytoremediation Work Team, USA*, 25pp.

Jamison V.W. *et al.*, 1975. Biodegradation of high octane gasoline in groundwater. *Dev. Ind. Microbiol*. 16: 305-311.

Kao, C. M. and C. C. Wang, 2000. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Wat. Res*. 34(13): 3413-3423.

Keuning, S., van der Waarde, J. en Baten, H.H.M. 1996. Biologische afbraak van BTEX en CKW bij in-situ biorestauratie – Afbreekbaarheid, vooronderzoek, karakterisatie en monitoring. CUR/NOBIS rapport 96.608
Leeson, A. and Hinchee, R.E. 1997. Soil Bioventing, Principles and Practice; CRC Lewis Publishers; Boca Raton; 244 pp.
Lovley, D. R., J. D. Coates, et al., 1995. Benzene Oxidation Coupled to Sulfate Reduction. *Applied and Environmental Microbiology* 61(3): 953-958.
Lovley, D.R., 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Reviews* 55(2): 259-287.
Lovley, D.R., D.J. Lonergan. 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1858-1964.
Madsen E.L., 1991. Determining in-situ biodegradation - facts and challenges. Environ Sci Technol 25: 663-1673
Matisova, E. et al., 1985. Quantitative analysis of Hydrocarbons in Gasolines by Capillary Gas-Liquid Chromatography. *J. Chromatography* 346: 177-190.
Matisova, E., 1985. Quantitative-analysis of hydrocarbons in gasolines. *Trac-trends in Analytical Chemistry* 4: 175-178.
Mulder, G.J., Van Ree, C.C.D.F. and Vreeken, C., 1999. Prediction and field testing of radius of influence for biosparging. Proc. In-Situ & On Site Bioremediation Symposium, 1999, San Diego, Batelle Press.
Nales, M., B. J. Butler, et al., 1998. Anaerobic benzene biodegradation: a microcosm survey. *Bioremediation journal* 2(2): 125-144.
Nielsen, P. H., H. Bjarnadottir, et al., 1995. In-Situ and Laboratory Studies on the Fate of Specific Organic- Compounds in an Anaerobic Landfill Leachate Plume .2. Fate of Aromatic and Chlorinated Aliphatic-Compounds. *Journal of Contaminant Hydrology* 20(1-2): 51-66.
Nobis, 1997. Verbetering van de positie van de in situ biodegradatievariant door toevoeging van imbibitie en drainage aan bestaande theorie. Eindrapport fase 1 (95-2-02).
Norris R.D. *et al*., 1994. Handbook of Bioremediation. Lewis Publishers – CRC Press, 257 pp.
Okx, J.P. and Van Ree, C.C.D.F. 1996. Biosparging and Bioventing – Expert Support System; CUR/NOBIS rapport 95-1-13
OVAM, 1996. Afvalstoffenanalyse Compendium.
OVAM, 2002. Code van goede praktijk – Pump & treat.
OVAM, 2002. Code van goede praktijk voor bodemluchtextractie en persluchtinjectie: Procedures voor haalbaarheidsonderzoek, opvolging en stopzetting.
OVAM, 2003. Code van goede praktijk – Natuurlijke attenuatie.
Pelz, O., A. Chatzinotas, et al., 2001. Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using 13C-incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization. FEMS Microb. Ecol. 38: 123-131.
Perry J.J., Cernigli C.E., 1973. Crude-oil degradation by filamentous fungi. Journal of General and Applied Microbiology 19: 151-153.
Pijls, C. 2000. Persluchtinjectie in vogelvlucht. In: “Cursus bodemsanering” TI-KVIV, Antwerpen, 2000.
Rabus, R., H. Wilkes, et al., 1999. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of Proteobacteria.” Environmental Microbiology 1(2): 145-157.
Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, F. Widdel. 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 59:1441-1451.

Reinhard, M., S. Shang, et al., 1997. In situ BTEX biotransformation under enhanced nitrate- and sulfate-reducing conditions. *Environmental Science & Technology* 31(1): 28-36.
Ridgeway, H.F. *et al.,* 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol*. 56 (11): 3565-3575.
Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils – Biological, Physical and Chemical Processes. Lewis Publishers, 542 blz.
Rugge, K., P. L. Bjerg, et al., 1999. An anaerobic field injection experiment in a landfill leachate plume, Grindsted, Denmark 1. Experimental setup, tracer movement, and fate of aromatic and chlorinated compounds. *Water Resources Research* 35(4): 1231-1246.
Schmidt, G.W., 1997. F*orensic* Geochemistry for Hydrocarbon Releases. *Proc. International Petroleum Environmental Conference*, Houston, p. 549.
Schreiber ME, Bahr JM, 2002. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. Journal Of Contaminant Hydrology 55: 29-56.
Seagren, E.A. and Becker, J.G., 1999. Organic acids as a bioremediation monitoring tool. In: In-Situ and On-Site Bioremediation, Fifth International Symposium, San Diego, CA.
Spence, M.J., Bottrell S.H., Thornton S.F. and Lerner, D.N., 2001. Isotopic modeling of the significance of bacterial sulphate reduction for phenol attenuation in a contaminated aquifer.
Suthersan, S., 1997. Remediation Engineering Design Concepts, S, CRC press, Boca Raton, USA, 362 blz.
U.S. EPA, 2000. Natural Attenuation of MTBE in the Subsurface under Methanogenic Conditions. EPA-report 600-R-00/006.
Van Beek, C.G.E.M. et al., 1998. Ontwerp en onderhoud van infiltratie- en onttrekkingsmiddelen. CUR/NOBIS rapport 96-3-06
Van de Velde, K.D. et al.1995. Stable Carbon Isotope Analysis to Verify Bioremediation and Bioattenuation. In: Monitoring and Verification of bioremediation, pp. 241-257; Hinchee, R.E. et al. (Ed.), Battelle Memorial Institute, Ohio, USA
Van der Waarde, J.J. et al. 1995. Enzyme assays as indicators for biodegradation. In: Contaminated Soil, Kluwer Academic Publishers.
Van der Waarde, J.J. et al. 1998. Effectiviteit van bioassays bij het monitoren en beoordelen van het milieurendement van in-situ biorestauratie. Fase 1, deelresultaat 1. CUR/NOBIS rapport 96-1-13
Van Ree, C.C.D.F., Kolkman, X.I. and Marnette, E.C.L. 1999. Protocol for the assessment of in situ respiration rates. In-Situ & On Site Bioremediation Symposium, San Diego, CA, Batelle Press.
Vito, 1998. Gids Bodemsaneringstechnieken, BBT Kenniscentrum, Vito, Academia Press, Gent, 213 blz.
Wang, Z., Fingas, M. and Page, D.S. 1999. Oil spill identification. J. of Chromatography A 843: 369-411.
Weiner, J. M. and D. R. Lovley, 1998. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 64(5): 1937-1939.
Weiner, J. M., T. S. Lauck, et al., 1998. Enhanced anaerobic benzene degradation with the addition of sulfate. *Bioremediation journal* 2(3&4): 159-173.
Wilson, B. H., G. B. Smith, et al., 1986. Biotransformations of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer material. *Environ. Sci. Technol*. 20(10): 997-1002.

Zeyer, J., E. P. Kuhn, et al., 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl Environ Microbiol* 52(4): 944-947.

Zheng, Z. P., P. Aagaard, et al., 2002. Sorption and anaerobic biodegradation of soluble aromatic compounds during groundwater transport. 2. Computer modeling. *Environmental Geology* 41(8): 933-941.

Zheng, Z., G. Breedveld, et al., 2001. Biodegradation of soluble aromatic compounds of jet fuel under anaerobic conditions: laboratory batch experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(4): 572-578.

7 Appendix 1: bioremediatievoorbeeld 1

7.1 Samenvatting

Appendix 1 doet verslag van Vito's opvolging van de in-situ sanering van een site te Vilvoorde. Dit bioremediatievoorbeeld illustreert het hoofdstuk 5.4 'Indicatieve parameters voor biodegradatie'. De bodem op deze locatie was verontreinigd met – in hoofdzaak – vluchtige aromaten. Door middel van biosparging is deze site gesaneerd. De operationele parameters van de biosparging (debieten, drukken, etc.) zijn niet opgevolgd door Vito; enkel de evolutie in de verontreinigingstoestand en de parameters die de mate van biodegradatie bepalen zijn door Vito gevolgd. De resultaten kunnen als volgt worden samengevat:

Bacterietellingen

Een viertal bodemstalen van verschillende diepten uit de kern van de verontreiniging werden uitgeplaat op verschillende types voedingsmedia. Uit de tellingen bleek dat het aantal bacteriën in de stalen relatief gering is, n.l. 10.000/g bij gebruik van rijk medium en 7000/g bij gebruik van tolueen als koolstofbron. Tolueenafbrekers werden aangetoond.

Analyse van stabiele koolstofisotopen ($^{12}C/^{13}C$)

Door het accumuleren van CO_2 afkomstig van biologische afbraak van olieproducten werd een *negatieve verschuiving* vastgesteld van $\delta^{13}C$ in functie van het gehalte aan anorganische opgeloste koolstof. In het huidige project kon geen verdere daling in de tijd worden vastgesteld omdat de isotopenverhouding reeds bij aanvang sterk verlaagd was (-20,1 ‰ tegen normaal ca. -10 ‰). Dit kan worden toegeschreven aan het feit dat, voordat de bioremediatie werd gestart, reeds sprake was van natuurlijke attenuatie. Als dusdanig bleek de isotopenanalyse dus een geschikte parameter voor het kwalitatief aantonen van natuurlijke afbraak van BTEX.

Volgen van afbraakkinetiek

Sommige stoffen die voorkomen in verontreinigingen zoals ruwe olie, benzine of minerale olie zijn relatief moeilijk afbreekbaar. Door het volgen van hun concentratie in functie van de tijd en in verhouding tot andere verontreinigingen kan het verloop van de bioremediatie worden gevolgd. De verhouding BTEX/trimethylbenzenen blijkt hierbij relevant: de verhouding daalt het meest drastisch voor tolueen, hetgeen in overeenstemming is met het gegeven dat tolueen het gemakkelijkst afbreekt van de BTEX. Voor de xylenen en tevens voor ethylbenzeen is er wel een daling t.o.v. 1,3,5 TMB, maar niet t.o.v. 1,2,4 TMB, hetgeen zou inhouden dat 1,3,5 het minst afbreekbaar is.

Metabolieten

Fenolen zijn tussenproducten bij de afbraak van BTEX. Voor de gevolgde site bleek de fenolindex in een reeks monitoringpeilbuizen reeds bij aanvang verhoogd, zoals eveneens werd vastgesteld voor de isotopenverhouding. Er werd geen duidelijke trend vastgesteld in het verdere verloop van de fenolindex: sommige peilbuizen vertoonden een stijgend gehalte, andere een dalend gehalte.

Alkaliniteit en geleidbaarheid van het grondwater

Als gevolg van biodegradatie wordt kooldioxide gevormd, dat wordt omgezet in koolzuur, bicarbonaat en carbonaat. Dit zou zich dan moeten uiten in een toename van de alkaliniteit en de DIC (dissolved inorganic carbon) na de start van de bioremediatie. Een zelfde verloop wordt verwacht van de elektrische geleidbaarheid. De pH zou theoretisch moeten dalen indien CO_2 wordt gevormd, door de vorming van koolzuur. Voor de locatie bleek er echter sprake van een dalende trend in EC en DIC gedurende de bioremediatie. Dit werd verklaard door aan te nemen dat beide parameters reeds verhoogd waren bij aanvang, en dat door de persluchtinjectie CO_2 uit de bodem werd verdreven.

Geochemische indicatoren

De redoxtoestand van het grondwater tijdens de sanering werd opgevolgd d.m.v. de meting van de redoxpotentiaal en het zuurstofgehalte van het grondwater. Tijdens de sanering werd een gemiddelde stijging vastgesteld van beide parameters. Ook was er een vrij eenduidig verband tussen beide parameters.

De gehalten aan nitraat (nutriënt en naast zuurstof een potentiële electronacceptor), ammonium en nitriet werden eveneens mee opgevolgd. Ten slotte werd ook het fosfaatgehalte gevolgd (nutriënt). Voor geen van deze parameters werden significante verbanden aangetoond met het verloop van de primaire verontreinigingsparameters.

Genoemde parameters variëerden wel sterk met plaats en tijd. De oorzaak van deze variabiliteit kon niet worden achterhaald.

7.2 Inleiding

BTEX-componenten zijn relatief goed biologisch afbreekbaar onder aërobe omstandigheden. Zuurstof is hierbij noodzakelijk en heeft een dubbele functie: (1) als elektronen-acceptor en (2) als co-substraat dat ingebouwd wordt in de polluent.

Wanneer zuurstof is opgebruikt (< 0,5 mg/l) en nitraat is beschikbaar dan zullen sommige micro-organismen nitraat gebruiken in plaats van zuurstof als elektronacceptor. Onderzoek heeft aangetoond dat tolueen, ethylbenzeen, m-, p- en o-xyleen, naftaleen en een reeks andere koolwaterstoffen kunnen worden gemineraliseerd onder nitraatreducerende omstandigheden. Wanneer de aanwezige zuurstof en nitraat zijn verbruikt dan kunnen de micro-organismen overgaan tot het gebruik van nog andere elektronacceptoren zoals opgeloste mangaan (Mn(IV)), opgelost ferri-ijzer (Fe3+), sulfaat of kooldioxide.

Onder zuurstoflimiterende condities vindt vaak een (tijdelijke) ophoping plaats van tussenproducten. Voor BTEX-afbraak zijn de voornaamste tussenproducten fenolen, catecholen en benzoëzuur.

Biodegradatie van TMB (met name de isomeren 1,3,5 en 1,2,4) is mogelijk onder aërobe omstandigheden. Volgens de huidige inzichten verloopt deze trager dan de afbraak van BTEX. Op basis van de beschikbare literatuurgegevens wordt aangenomen dat 1,3,5-trimethylbenzeen niet biodegradeerbaar is onder anaërobe omstandigheden. Omdat trimethylbenzenen minder oplosbaar, vluchtig en biodegradeerbaar zijn dan BTEX kunnen zij de toxiciteit van verweerde benzine domineren.

Op de gevolgde locatie te Vilvoorde komt een verontreiniging voor met – in hoofdzaak – vluchtige aromaten. Door middel van biosparging wordt deze site momenteel gesaneerd.

Het saneringssysteem bestaat uit 32 spargepunten; de luchtextractie gebeurt d.m.v. een vertakte (over de spargelocaties verspreid) horizontale drain. Onder *7.7 Bespreking*, resultaten, is een situatietekening (Figuur 9) opgenomen waar de locaties van de onderdelen van het saneringssysteem zijn verduidelijkt, en waarop tevens de locaties van de monitoringspeilbuizen zijn aangeduid.

7.3 Uitgevoerde veldwerkzaamheden

Om het bioremediatieproces optimaal te kunnen laten verlopen of sturen is een *goede bewaking* (monitoring) van het proces noodzakelijk.

Het verloop van het bioremediatieproces kan in eerste instantie gevolgd worden door het meten van de gehalten van de verontreinigingen in de bodem waaruit de afbraaksnelheid kan worden afgeleid. De concentraties van verontreinigingen kunnen ook wijzigen onder invloed van fysische processen die niet gerelateerd zijn aan biodegradatie (vervluchtiging, dispersie in grondwater, sorptie aan aquifermateriaal). Daarnaast kunnen de concentraties in bodem- of grondwaterstalen sterk wijzigen naargelang de plaats (door de heterogeniteit van de bodem) of het tijdstip van staalname (verdunning door neerslag, tijdelijke wijzigingen in grondwaterstroming). Een daling van de concentraties van verontreinigingen is daarom niet noodzakelijk te wijten aan biodegradatie. Het is dan ook aangewezen om het biodegradatieproces op te volgen door het volgen van parameters die specifiek verbonden zijn met de microbiële activiteit. Deze omvatten zowel indicatieve als kwantitatieve parameters.

7.3.1 Indicatieve parameters voor biodegradatie

Deze tonen aan dat biodegradatie beter of trager verloopt in functie van de tijd. Zij omvatten onder andere:

- bacterietellingen
- microbieel moleculair materiaal
- enzymactiviteit (dehydrogenase, esterase)
- isotopenverhouding $^{12}C/^{13}C$
- biomerkers (n-C18/phytaan/pristaan, koolwaterstof/hopaan).
- vorming van metabolieten
- kooldioxide en alkaliniteit.
- geochemische indicatoren

In voorliggende gevalstudie zijn van de bovenstaande lijst, volgende items onderzocht:

Bacterietellingen

Aan de hand van bacterietellingen op specifiek medium kan men nagaan of er in de bodem van nature bacteriën voorkomen die de contaminanten kunnen afbreken en, zo ja, hoeveel bacteriën er per gram grond kunnen worden aangetoond.

Analyse van stabiele koolstofisotopen ($^{12}C/^{13}C$)

Aan de hand van een analyse van de verhouding van de stabiele koolstofisotopen ^{12}C en ^{13}C in de restverontreiniging, CO_2, natuurlijk organisch materiaal en eventueel methaan in de bodem kan men biodegradatie aantonen. Deze analyse gebeurt relatief eenvoudig en goedkoop met behulp van isotopen massaspectrometrie.

Micobiële afbraak van koolwaterstoffen met vorming van anorganische koolstof veroorzaakt een verschuiving van de isotopenverhoudingen van deze producten. Olieproducten hebben een $\delta^{13}C$ van ongeveer –29,7. Bij aërobe biodegradatie treedt een beperkte wijziging op van $\delta^{13}C$ in de geproduceerde CO_2, die dus een isotopenshift heeft gelijkaardig aan die van het uitgangsmateriaal. De $\delta^{13}C$ van kooldioxide van atmosferische oorsprong is ongeveer –10 tot –12, deze afkomstig van het oplossen van kalk ongeveer +0,7.

Door het accumuleren van CO_2 afkomstig van biologische afbraak van olieproducten zal er dus een *negatieve verschuiving* optreden van $\delta^{13}C$ van de anorganische opgeloste koolstof. Men kan de evolutie van de koolstofisotopenverhouding in kooldioxide gebruiken om na te gaan wanneer de biologische afbraak van de verontreiniging stagneert. In dit geval zal de isotopenverhouding evolueren naar deze van CO_2 in de niet verontreinigde achtergrond.

Bij anaërobe biodegradatie onder methanogene omstandigheden wordt echter een toename van $\delta^{13}C$ waargenomen (+48). Omdat aërobe en anaërobe afbraakprocessen een tegengestelde verschuiving veroorzaken dient men voorzichtig te zijn met de interpretatie van gegevens van isotopenanalyse wanneer deze processen simultaan voorkomen.

Metabolieten

De biologische afbraak van verontreinigingen kan worden aangetoond door het meten van tussenproducten van biodegradatie. Voor BTEX-afbraak zijn de voornaamste tussenproducten fenolen en benzoëzuur. Deze stoffen zijn echter opzichzelf weer koolstofbronnen voor aërobe afbraak, en zullen dus in de loop van de biodegradatie terug moeten verdwijnen.

Bovenstaande analysen zijn niet eenvoudig en worden niet routinematig gebruikt. Het meten van het gehalte opgeloste organische koolstof in het grondwater (DOC) kan misschien gebruikt worden als groepsparameter voor het meten van metabolieten die anders niet worden waargenomen in standaard analysepaketten, hetgeen in voorliggende gevalstudie is nagegaan.

Alkaliniteit en geleidbaarheid van het grondwater

Als gevolg van biodegradatie worden koolwaterstoffen geoxideerd tot ondermeer organische zuren en kooldioxide. Kooldioxide wordt via het koolzuurevenwicht omgezet in koolzuur, bicarbonaat en carbonaat, waardoor de alkaliniteit verhoogt:

$$CO_2 + H_2O <==> H_2CO_3 <==> H^+ + HCO_3^- <==> H^+ + CO_3^{2-}$$

Onder invloed van de zure werking van koolzuur en ook van de intermediaire organische zuren zal ook de in de bodem aanwezige kalk (carbonaten) in oplossing gaan, met als gevolg een *verhoging van de alkaliniteit* van het grondwater. De bovenstaande processen zorgen naast een verhoging van de

alkaliniteit ook voor een *toename van de specifieke elektrische geleidbaarheid* van het grondwater.

7.4 Operationele procesparameters

Het meten van de operationele procesparameters wordt uitgevoerd om na te gaan of het technisch proces op een stabiele manier voldoet aan de ontwerpvereisten. Dit monitoren van de performantie van bioremediatie is intensiever dan het monitoren van de saneringsdoelstellingen (concentraties van verontreinigingen) op zich.

Bij de performantiemonitoring bij *biosparging* worden volgende aspecten opgevolgd:

- *Aantal draaiuren van de installatie* (continue opvolging).
- *Extractie(injectie)debieten en drukken*.
- *Invloedstraal per luchtextractie(injectie)filter*.
- *Gehalten en verdeling van zuurstof en kooldioxide in de onverzadigde zone*.
- *Vochtgehalte in de onverzadigde zone*.
- *Werking en zuiveringsrendementen van de luchtzuivering*
- *Concentraties van verontreinigingen in de omgevingslucht*

7.5 Uitvoering veldwerk

7.5.1 Vaststellen nulsituatie (2/10/2000)

Het grondwater van 11 geselecteerde peilbuizen is bemonsterd volgens de standaard procedures. Hierbij zijn de waterpeilen tov top peilbuis en maaiveld opgetekend en zijn in het veld de parameters pH, EC, Eh, temperatuur en zuurstofgehalte (veldmethode) geregistreerd. De waterstalen zijn door Vito geanalyseerd op DOC, DIC, zuurstofgehalte (laboratoriummethode), organische screening, fenolindex; alkaliniteit, nitraat, nitriet, fosfaat, isotopenanalyse.

Met de Geoprobe is tevens een kernboring uitgevoerd op diepten van 2,0 tot 6,6 m-mv. op een punt gelegen tussen PB 110 en 201. De hulzen zijn afgesloten met was en tape Na uitvoering is het boorgat opgevuld met bentoniet. De inhoud van de hulzen zijn, alvorens substalen voor analyses te selecteren, visueel beschreven (boorstaat).

De mengstalen zijn opgemaakt per sectie en vervolgens opgesplitst in deelstalen voor bepaling van:

a) droge stof, asrest, pH, TOC
b) bepaling totaal kiemgetal en isolatie bacteriën
c) chemische analyse organische parameters BTEX, VOCl, vluchtige kws (C6-C10)
d) chemische analyse anorganische parameters (carbonaat)
e) een staal dat bestemd voor isotopenanalyse .

De bodemlucht is eveneens bemonsterd via de bestaande extractiefilters met een PID en/of dräger-CMS (benzeen, tolueen, vinylchloride en PER).

Op vier locaties in de verontreinigde kern zijn, op een halve meter van de luchtinjectiefilters, diffusieve samplers aangebracht op een diepte van 40 cm. Deze zijn geplaatst in een glazen vial. Dit gebeurde in gaten die werden aangemaakt met een edelmanboor. Het boorgat is afgepropt met een vochtige doek en daarop is een stuk plastic geplaatst waarop een gewicht wordt gelegd om infiltratie van regenwater te voorkomen. De samplers zijn later terug geanalyseerd op BTEX, vluchtige koolwaterstoffen (C6-C10) en VOCl.

7.5.2 Volgende bemonsteringsrondes grondwater

Het grondwater uit de 11 monitoringsfilters is na de start van de biosparging, bemonsterd op de data 23/11/2000; 14/03/2001; 02/08/2001 en 17/12/2001.

De operationele parameters van de biosparging (debieten, drukken, etc.) zijn niet opgevolgd door Vito; enkel de evolutie in de verontreinigingstoestand en de parameters die de mate van biodegradatie bepalen zijn door Vito gevolgd. Een aantal operationele aspecten zijn echter meegedeeld door de aannemer en opgenomen in voorliggend rapport.

7.6 Resultaten

7.6.1 Vaststelling nulsituatie (02/10/2000)

De meetresultaten bedoeld voor het vaststellen van de nulsituatie zijn weergegeven in tabellen 13 en 14.

Tabel 13. Veldmetingen

Parameter	Pb:	100	102	110	150	151	152	153	155	157	201	106
Filterdiepte	m-top pb	2-4	2-4	1,8-3,8	2-4	2-4	2-4	6-7	2-4	-	-	1,5-3,5
Grondwaterpeil	cm-pb	(*)	256	218	219	184	254	240	272	249		281
PH	-	7,25	6,82	6,74	7,2	7,16		6,97	7,2	6,89		
Redoxpotentiaal	MV	-104	-196	-199	-195	49		-98		-251		
Geleidbaarheid	µS/cm	1439	2610	2050	1539	1758		1206	1535	2800		
opgeloste O_2	Mg/l	1,41	0,7	0,09	0,16	1,25		1,11		0,72		
Temperatuur	℃	15,9	16,5	17,3	17,1	17,6		15,2	16,9	17,1		

* droog na afpompen

Tabel 14. Secundaire parameters voor biodegradatie

Pb	Alkal BC/pH 4,3 Mmol/l	Alkal BC/pH 8,3 mmol/l	Tot. P mg/l	NH4-N mg/l N	Totaal geox. N mg/l	DOC mg/l C	DIC mg/l C	Fenol index µg/l	Isotopen D-12C/13C 0/00
5	9,21	0,75	-	-	-	12	117	< 1	
100	7,93	0,48	< 0,15	< 1	13,95	< 1	106	< 1	
102	8,56	1,05	< 0,15	< 1	1,64	6	108	25	-18,4
110	14,8	1,15	0,49	< 1	< 0,1	5	165	764	-21,5
150	6,05	0,43				7	82	< 1	-19,2
151	6,62	0,36				5	80	< 1	
153	8,34	0,64	< 0,15	< 1	0,175	6	101	< 1	
155	8,7	0,39	< 0,15	< 1	6,34	4	103	< 1	-21,2

7.6.2 Operationele parameters (uitgevoerd door aannemer)

De biosparging-eenheid werd voorzien van een PLC-sturing, waarbij een schakeltijd van 15 minuten werd voorzien per groep van spargepunten. Volgende groepsverdeling werd hierbij gehanteerd (tabellen 15, 16 en 17):

Tabel 15. PLC-groepsverdeling van biospargepunten

sparger	50	51	45	24	43	40
PLC groep I	1	2	4	3	5	0
sparger	47	52	41	44	49	46
PLC groep II	5	3	1	2	0	4
Sparger	23	20	22	21	48	42
PLC groep III	1	0	2	3	5	4

Tabel 16. Injectiedrukken en -debieten

sparger	PLC-groep	Injectiedruk (bar)	Injectiedebiet (l/min)
20	0	6,5	60
21	3	6,7	48
22	2	7,2	37
23	1	6,6	40
24	3	6,9	76
40	0	6,5	90
41	1	6,6	56
42	4	6,7	46
43	5	6,7	67
44	2	6,9	50
45	4	7,1	51
46	4	7,0	50
47	5	6,7	35
48	5	6,6	62
49	0	6,5	57
50	1	6,9	87
51	2	7,2	42
52	3	6,6	35

Tabel 17. Grondwaterstand voor en tijdens sparging

Pb	Voor sparging (m-top pb)	Tijdens sparging (m-top pb)	Verschil (m)
5	2,24	2,25	-0,01
102	2,45	2,60	-0,15
106	2,57	2,70	-0,13
110	2,33	2,16	+0,17
113	Droog	droog	-
152	2,41	2,48	-0,07
153	2,43	2,41	+0,02
154	2,35	2,38	-0,03
202	2,35	2,28	+0,07
X1	2,34	2,30	+0,04
X2	2,37	2,68	-0,31

7.6.3 Meetcampagne 2 (23/11/2000)

De meetgegevens voor de tweede meetronde zijn weergegeven in tabellen 18 en 19.

Tabel 18. Veldmetingen

Parameter	Pb:	100	102	110	150	151	152	153	155	157	201	106
Grondwaterpeil	cm-pb	246	236	192	2,05	187	268	227	251	230		223
PH	-	7,22	6,79	7	7,12		7,67	6,92	7,03			
Redoxpotentiaal	mV	254	-332	8	-108		102	-69	-118			
Geleidbaarheid	µS/cm	1387	1754	1440	1596		1262	1358	1670			
opgeloste O_2	mg/l	4,95	0,21	3,02	0,77		8,14	0,36	1,08			
Temperatuur	℃	11,1	14,6	14,2	15,3		15,6	14,7	14,6			

Tabel 19. Secundaire parameters voor biodegradatie

Pb	Alkal BC/pH 4,3 Mmol/l	Alkal BC/pH 8,3 mmol/l	Tot. P mg/l	NH4-N mg/l N	Totaal geox. N mg/l	DOC Mg/l C	DIC mg/l C	Fenol index µg/l	Isotopen D-12C/13C 0/00
102						22	120		-17,8
110						17	71		-18,3
150						1	73		-19,4
152						6	50		-14,5
155						11	100		-21,7

7.6.4 Meetcampagne 3 (14/03/2001)

De meetgegevens voor de derde meetronde zijn weergegeven in tabellen 20 en 21.

Tabel 20. Veldmetingen

Parameter	Pb:	100	102	110	150	151	152	153	155	157	201	106
Grondwaterpeil	cm-pb	242	222	198	196	167	210	217	243	225	195	230
PH	-	7,28	6,59	7,09	7,28	6,95	7,84	7,21	7,33		7,76	7,52
Redoxpotentiaal	mV	30	-49	-23	17	40	61	-216	-37		53	85
Geleidbaarheid	µS/cm	1102	2200	1670	1372	2410	1061	969	1515		794	771
opgeloste O_2	mg/l	7,2	1,2	7,55	1	4,29	8,75	0,36	3,66		10,62	12,35
Temperatuur	℃	11	10,9	10,5	11,4	10,9	13,5	13,5	10,7		13	14,5

Tabel 21. Secundaire parameters voor biodegradatie

Pb	Alkal BC/pH 4,3 Mmol/l	Alkal BC/pH 8,3 mmol/l	o-fosfaat mg/l	NH4-N mg/l N	Nitraat mg/l	nitriet mg/l	DOC mg/l C	DIC mg/l C	Fenol index µg/l
100	9,42	0,79	< 0,15	< 0,1	23,9	< 0,07	24	120	6,5
102	9,79	3,5	< 0,15	1,6	689	6,5		134	12
106	1,03	0,08		< 0,1		< 0,07	5	12	
110	7,33	1,45	< 0,15	1,22	57,9	8,12	36	90	42
150	5,89	0,42	0,512	< 0,1	30,3	< 0,07	2	74	7,3
151	7,17	1,04	5,52	< 0,1	42,9	< 0,07	27	97	5,5
152	4,52	0,13	< 0,15	0,56	46,7	0,23	7	41	4,9
153	7,29	0,81	< 0,15	0,12	< 1	< 0,07	8	95	18
155	8,20	1,02	< 0,15	< 0,1	32,7	< 0,07	13	105	6,5
201	15,8	0,08	< 0,15	< 0,1	21,9	< 0,07	9	21	3,3

7.6.5 Meetcampagne 4 (02/08/2001)

De meetgegevens voor de vierde meetronde zijn weergegeven in tabellen 22 en 23.

Tabel 22. Veldmetingen

Parameter	Pb:	100	102	110	150	151	152	153	155	157	201	106
Grondwaterpeil	cm-pb											
PH	-	7,18	6,75	7,03	7,19	6,84	7,3	7,02	7,17		7,74	
Redoxpotentiaal	mV	62	-117	-68		26	47	-244			11	
Geleidbaarheid	µS/cm	1330	2610	1292	1201	2,63	1230	1097	1335		742	
opgeloste O_2	mg/l	3,81	1,16	3,28		0,28	8,08	4,31			8,86	
Temperatuur	℃	17,9	17,4	18,5	18,5	17,8	19,2	15,9	17,2		18	

Tabel 23. Secundaire parameters voor biodegradatie

Pb	Alkal BC/pH 4,3 Mmol/l	Alkal BC/pH 8,3 mmol/l	o-fosfaat mg/l	NH4-N mg/l N	Nitraat mg/l	nitriet mg/l	DOC mg/l C	DIC mg/l C	Fenol index µg/l
100	8,82	1,11	<0,5	<0,1	47,9	<0,066	6	106	<1
102	12,8	3,76	<0,5	1,30	<1	<0,066	18	75	56
110	9,91	1,53	5,49	0,88	1874	<0,066	22	42	46
150	5,88	0,759	<0,5	<0,1	25,1	0,078	3	70	<1
151	7,24	1,74	1,91	<0,1	24,3	0,067	1	89	10
152	16,5	0,298	0,76	<0,1	85,5	<0,066	13	53	<1
153	8,42	1,65	<0,5	0,24	<1	<0,066	1	105	12
155	6,83	0,83	2,67	<0,1	31,3	<0,066	43	66	22
201	3,39	0,0475	2,49	<0,1	12,8	<0,066	49	23	<1

7.6.6 Meetcampagne 5 (12/12/2001)

De meetgegevens voor de vijfde meetronde zijn weergegeven in tabellen 24 en 25.

Tabel 24. Veldmetingen

Parameter		100	102	110	150	151	152	153	155	157	201	154
Grondwaterpeil	cm-pb											
pH	-	7,3	7,72	6,2	7,35	7,19	8,12	6,59	7,33		7,86	6,42
redoxpotentiaal	mV	122	61	-5	110	152	102	-100	1		105	-57
geleidbaarheid	µS/cm	1031	1649	1627	964	1644	951	1895	959		721	745
opgeloste O_2	mg/l	6,35	8,5	6,05	1,85	3,64	9,77	3,19	3,5		9	1,81
temperatuur	℃	10,8	13	11,6	12,5	13,3	11,4	11,8	8,9		11,2	10,9

Tabel 25. Secundaire parameters voor biodegradatie

Pb	Alkal BC/pH 4,3 mmol/l	Alkal BC/pH 8,3 mmol/l	o-fosfaat mg/l	NH4-N mg/l N	Nitraat mg/l	nitriet mg/l	DOC mg/l C	DIC mg/l C	Fenol Index µg/l
100	8,84	0,84	< 0,5	< 0,1	19	< 0,066	8	108	< 20
102	4,27	0,35	< 0,5	< 0,1	2	1,12	9	45	< 20
110	2,19	1,86	< 0,5	3,39	220	8,8	54	30	67
150	6,45	0,53	< 0,5	< 0,1	22	0,097	< 1	84	< 20
151	6,62	1,04	16,8	< 0,1	14	< 0,066	< 1	81	< 20
152	3,95	0,08	0,96	0,18	35	< 0,066	5	29	< 20
153	15,4	2,51	< 0,5	0,18	< 1	< 0,066	4220	45	810
155	5,00	0,4	< 0,5	< 0,1	33	< 0,066	4	60	< 20
201	2,6	0,07	< 0,5	< 0,1	7,8	< 0,066	< 1	26	< 20

7.6.7 Resultaten primaire verontreinigingsparameters (per peilbuis voor de verschillende meetrondes)

Om de evoluties van de primaire verontreinigingsparameters in de loop van de tijd weer te geven, zijn deze meetgegevens per peilbuis gegroepeerd. Dit is weergegeven in de tabellen 26 t/m 35.

Tabel 26. Analyseresultaten peilbuis 102

Parameters	Nul-	24/08/00	23/11/00	14/03/01	2/08/01	12/12/01
Aromaten in µg/l						
benzeen	0	0	0	0	0	0
tolueen	1056	48	570	170	3	1
ethylbenzeen	216	470	950	430	30	8
m+p-xyleen	616	1400	2700	900	85	20
m-xyleen	452	-				
p-xyleen	164	-				
o-xyleen	168	290	750	230	35	13
styreen	5		<	<	<	<
isopropylbenzeen	18		100	49	4	1
propylbenzeen	101		575	270	18	4
1,3,5-trimethylbenzeen	428		1600	560	90	25
tert. Butylbenzeen	245		<	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	1993		6700	2500	485	40
sec. butylbenzeen	17		70	30	3	<
p-isopropyltolueen	109		510	290	45	1
n-butylbenzeen	159		<	<	<	<
naftaleen	24	18	15	18	3	<
Alkanen in µg/l						
MTBE	<	<	<	<	<	<
n-hexaan	3,7		<	<	<	<
n-heptaan	<		<	<	<	<
n-octaan	<		<	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen-						
dichloromethaan	19	<	<	<	<	< 5
1,1-dichloroethaan	<	<	<	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	<	<	<	<	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<	<	<	<
chloroform	<	<	<	<	<	<
1,2-dichloroethaan	<	<	<	<	<	<
trichloroethyleen	<	<	<	<	<	<
1,2-dichloropropaan	<	<	<	<	<	<
bromodichloromethaan	<	<	<	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	46	<	<	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<	<	<	<
tetrachloroethyleen	<	<	4	<	<	<
Esters in µg/l						
ethylacetaat						1000

Tabel 27. Analyseresultaten peilbuis 100

Parameters	14/03/01	2/08/01	12/12/02
Aromaten in µg/l			
Benzeen	<	<	<
Tolueen	45	<	<
Ethylbenzeen	14	<	<
m+p-xyleen	96	<	<
m-xyleen			
p-xyleen			
o-xyleen	13	<	<
Styreen	<	<	<
Isopropylbenzeen		<	<
Propylbenzeen	1	<	<
1,3,5-trimethylbenzeen	4	<	<
tert. Butylbenzeen	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	21	<	<
sec. butylbenzeen	<	<	<
p-isopropyltolueen	<	<	<
n-butylbenzeen	<	<	<
Naftaleen	<	<	<
Alkanen in µg/l			
MTBE	<	<	<
n-hexaan	<	<	<
n-heptaan	<	<	<
n-octaan	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l			
Dichloromethaan	<	<	< 5
1,1-dichloroethaan	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	<	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<
Chloroform	<	<	<
1,2-dichloroethaan	<	<	<
Trichloroethyleen	<	<	<
1,2-dichloropropaan	<	<	<
Bromodichloromethaan	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<
Tetrachloroethyleen	<	<	<

Tabel 28. Analyseresultaten peilbuis 110

Parameters	24/08/00	2/10/00	23/11/00	14/03/01	2/08/01	12/12/01
Aromaten in µg/l						
benzeen	2700	1907	90	45	16	8
tolueen	5400	2053	150	340	10	90
ethylbenzeen	1900	956	70	77	9	15
m+p-xyleen	5500	2455	300	320	11	180
m-xyleen	-	1509				
p-xyleen	-	946				
o-xyleen	1500	622	75	120	6	255
styreen		24	<	<	<	<
isopropylbenzeen		35	2	2	<	2
propylbenzeen		79	3	5	1	3
1,3,5-trimethylbenzeen		203	70	37	2	45
tert. Butylbenzeen		<	<	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen		772	175	75	13	60
sec. butylbenzeen		2	<		<	<
p-isopropyltolueen		2	2	<	<	1
n-butylbenzeen		54	<	<	<	<
naftaleen	200	119	<	10	1	17
Alkanen in µg/l						
MTBE		89	6	<	1	<
n-hexaan		45	<	<	1	<
n-heptaan		6	<	<	1	<
n-octaan		2	<	<	1	<
Chloorkoolwaterstoffen - µg/l						
dichloromethaan		9	<	<	<	< 5
1,1-dichloroethaan		<	<	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis		<	<	<	<	<
2,2-dichloropropaan		1	<	<	<	<
chloroform		1	<	<	<	<
1,2-dichloroethaan		2	<	<	<	<
trichloroethyleen		<	<	<	<	<
1,2-dichloropropaan		4	<	<	<	<
bromodichloromethaan		18	<	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans		95	<	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan		14	<	<	<	<
tetrachloroethyleen		<	<	<	<	<

Tabel 29. Analyseresultaten peilbuis 150

Parameters	23/nov	14/mrt	2/aug	12/dec
Aromaten in µg/l				
benzeen	<	<	<	<
tolueen	2		<	<
ethylbenzeen	5	1	<	<
m+p-xyleen	10	3	<	<
m-xyleen				<
p-xyleen				<
o-xyleen	5	1	<	<
styreen	<	<	<	<
isopropylbenzeen	<		<	<
propylbenzeen	3	1	<	<
1,3,5-trimethylbenzeen	8	2	<	<
tert. Butylbenzeen	<	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	25	11	<	<
sec. butylbenzeen	<		<	<
p-isopropyltolueen	2	1	<	<
n-butylbenzeen	<	<	<	<
naftaleen	<	<	<	<
Alkanen in µg/l				
MTBE	<	<	<	<
n-hexaan	3	<	<	<
n-heptaan	<	<	<	<
n-octaan	<	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l				
dichloromethaan	<	<	<	<
1,1-dichloroethaan	<	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	<	<	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<	<
chloroform	<	<	<	<
1,2-dichloroethaan	<	<	<	<
trichloroethyleen	2	<	<	<
1,2-dichloropropaan	<	<	<	<
bromodichloromethaan	<	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	<	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<	<
tetrachloroethyleen	3	<	<	<

Tabel 30. Analyseresultaten peilbuis 151

Parameters	2/okt	14/mrt	2/aug	12/dec
Aromaten in µg/l				
benzeen	<	<	<	<
tolueen	1,1		<	<
ethylbenzeen	<	1	<	<
m+p-xyleen		3	<	<
m-xyleen	0,3			
p-xyleen	0,3			
o-xyleen	0,5	1	<	<
styreen	<	<	<	<
isopropylbenzeen	<		<	<
propylbenzeen	<	1	<	<
1,3,5-trimethylbenzeen	<	2	<	<
tert. Butylbenzeen	<	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	0,3	11	<	<
sec. butylbenzeen	<		<	<
p-isopropyltolueen	<	1	<	<
n-butylbenzeen	<	<	<	<
naftaleen	<	<	<	<
Alkanen in µg/l				
MTBE	<	<	<	<
n-hexaan	1,8	<	<	<
n-heptaan	0,8	<	<	<
n-octaan	<	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l				
dichloromethaan	8,9	<	<	< 5
1,1-dichloroethaan	<	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	<	<	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<	<
chloroform	<	<	<	<
1,2-dichloroethaan	1,4	<	<	<
trichloroethyleen	<	<	<	<
1,2-dichloropropaan	<	<	<	<
bromodichloromethaan	<	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	<	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<	<
tetrachloroethyleen	<	<	<	<

Tabel 31. Analyseresultaten peilbuis 152

Parameters	14/mrt	2/aug	12/dec
Aromaten in µg/l			
Benzeen	<	<	<
Tolueen	4	<	<
Ethylbenzeen	11	<	<
m+p-xyleen	25	<	<
m-xyleen			
p-xyleen			
o-xyleen	6	<	<
Styreen	<	<	<
Isopropylbenzeen	1	<	<
Propylbenzeen	7	<	<
1,3,5-trimethylbenzeen	16	<	<
tert. Butylbenzeen	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	88	<	<
sec. butylbenzeen		<	<
p-isopropyltolueen	7	<	<
n-butylbenzeen	<	<	<
Naftaleen	<	<	<
Alkanen in µg/l			
MTBE	<	<	<
n-hexaan	<	<	<
n-heptaan	<	<	<
n-octaan	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l			
Dichloromethaan	<	<	< 5
1,1-dichloroethaan	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	<	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<
Chloroform	<	<	<
1,2-dichloroethaan	<	<	<
Trichloroethyleen	<	<	<
1,2-dichloropropaan	<	<	<
Bromodichloromethaan	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<
Tetrachloroethyleen	<	<	<

Tabel 32. Analyseresultaten peilbuis 153

Parameters	2/okt	14/mrt	2/aug	12/dec
Aromaten in µg/l				
Benzeen	0,6	<	<	4
Tolueen	1,9	4	1	7
Ethylbenzeen	17,1	61	43	130
m+p-xyleen		30	4	130
m-xyleen	1,9			
p-xyleen	9,8			
o-xyleen	3,0	14	3	40
Styreen	<	<	<	<
Isopropylbenzeen	1,0	3	2	5
Propylbenzeen	4,4	15	8	25
1,3,5-trimethylbenzeen	1,9	1	<	20
tert. Butylbenzeen	4,2	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	35,8	150	40	190
sec. butylbenzeen	0,6	1	<	2
p-isopropyltolueen	0,2	1	<	1
n-butylbenzeen	1,6	<	<	<
Naftaleen	1,9	4	2	4
Alkanen in µg/l				
MTBE	<	<	<	<
n-hexaan	1,8	<	<	<
n-heptaan	0,6	<	<	<
n-octaan	<	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l				
Dichloromethaan	8,0	<	<	70
1,1-dichloroethaan	0,5	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	2,6	5	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<	<
Chloroform	<	<	<	<
1,2-dichloroethaan	7,1	<	5	5
Trichloroethyleen	0,5	<	<	4
1,2-dichloropropaan	<	<	<	<
Bromodichloromethaan	<	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	<	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<	<
Tetrachloroethyleen	<	<	<	13
Esters in µg/l ($)				
Ethylacetaat				2000

$: semi-kwantitatief

Tabel 33. Analyseresultaten peilbuis 106

Parameters	14/mrt
Aromaten in µg/l	
Benzeen	<
Tolueen	5
Ethylbenzeen	2
m+p-xyleen	7
m-xyleen	
p-xyleen	
o-xyleen	3
Styreen	<
Isopropylbenzeen	
Propylbenzeen	
1,3,5-trimethylbenzeen	
tert. Butylbenzeen	<
1,2,4-trimethylbenzeen	1
sec. butylbenzeen	<
p-isopropyltolueen	<
n-butylbenzeen	<
Naftaleen	<
Alkanen in µg/l	
MTBE	<
n-hexaan	<
n-heptaan	<
n-octaan	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l	
Dichloromethaan	<
1,1-dichloroethaan	<
1,2-dichloroetheen, cis	<
2,2-dichloropropaan	<
Chloroform	<
1,2-dichloroethaan	<
Trichloroethyleen	<
1,2-dichloropropaan	<
Bromodichloromethaan	<
1,3-dichloropropeen, trans	<
1,1,2-trichloroethaan	<
Tetrachloroethyleen	<

Tabel 34. Analyseresultaten peilbuis 155

Parameters	2/okt	23/nov	14/mrt	2/aug	12/dec
Aromaten in µg/l					
benzeen	1,9	<	<	<	<
tolueen	3,2	1	<	1	1
ethylbenzeen	0,9	4	3	<	<
m+p-xyleen		8	6	<	3
m-xyleen	1,0				
p-xyleen	0,8				
o-xyleen	0,8	3	2	<	3
styreen	<	<	<	<	<
isopropylbenzeen	<	<	<	<	<
propylbenzeen	<	2	2	<	<
1,3,5-trimethylbenzeen	<	5	4	<	<
tert. Butylbenzeen	<	<	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	0,3	20	24	<	2
sec. butylbenzeen	<	<	<	<	<
p-isopropyltolueen	<	1	2	<	<
n-butylbenzeen	<	<	<	<	<
naftaleen	<	<	<	<	<
Alkanen in µg/l					
MTBE	<	<	<	<	<
n-hexaan	1,8	<	<	<	<
n-heptaan	<	<	<	<	<
n-octaan	<	<	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l					
dichloromethaan	8,8	<	<	<	< 5
1,1-dichloroethaan	<	<	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	<	<	<	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<	<	<
chloroform	<	<	<	<	<
1,2-dichloroethaan	<	<	<	<	<
trichloroethyleen	<	<	<	<	<
1,2-dichloropropaan	<	<	<	<	<
bromodichloromethaan	<	<	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	<	<	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<	<	<
tetrachloroethyleen	<	2	<	<	<

Tabel 35. Analyseresultaten peilbuis 201

Parameters	14/mrt	2/aug	12/dec
Aromaten in µg/l			
Benzeen	3	<	<
Tolueen	30	1	<
Ethylbenzeen	9	1	<
m+p-xyleen	41	2	<
m-xyleen	<		
p-xyleen	<		
o-xyleen	15	1	<
Styreen	<	<	<
Isopropylbenzeen	<	<	<
Propylbenzeen	<	<	<
1,3,5-trimethylbenzeen	5	2	<
tert. Butylbenzeen	<	<	<
1,2,4-trimethylbenzeen	11	10	<
sec. butylbenzeen	<	<	<
p-isopropyltolueen	<	1	<
n-butylbenzeen	<	<	<
Naftaleen	<	<	<
Alkanen in µg/l			
MTBE	<	<	<
n-hexaan	<	<	<
n-heptaan	<	<	<
n-octaan	<	<	<
Chloorkoolwaterstoffen in µg/l			
Dichloromethaan	<	<	< 5
1,1-dichloroethaan	<	<	<
1,2-dichloroetheen, cis	<	<	<
2,2-dichloropropaan	<	<	<
Chloroform	<	<	<
1,2-dichloroethaan	<	<	<
Trichloroethyleen	<	<	<
1,2-dichloropropaan	<	<	<
Bromodichloromethaan	<	<	<
1,3-dichloropropeen, trans	<	<	<
1,1,2-trichloroethaan	<	<	<
Tetrachloroethyleen	<	<	<

7.7 Bespreking

De resultaten van de verschillende uitgevoerde metingen (indicatieve parameters voor biodegradatie) worden in dit hoofdstuk achtereenvolgens besproken, waarbij het nut van deze metingen voor de huidige locatie wordt geëvalueerd. De evolutie in de tijd van de belangrijkste verontreinigingsparameters in de verschillende monitoringspeilbuizen op de locatie is weergegeven op de volgende 3 pagina's (figuren 9 t/m 11).

7.7.1 Bacterietellingen

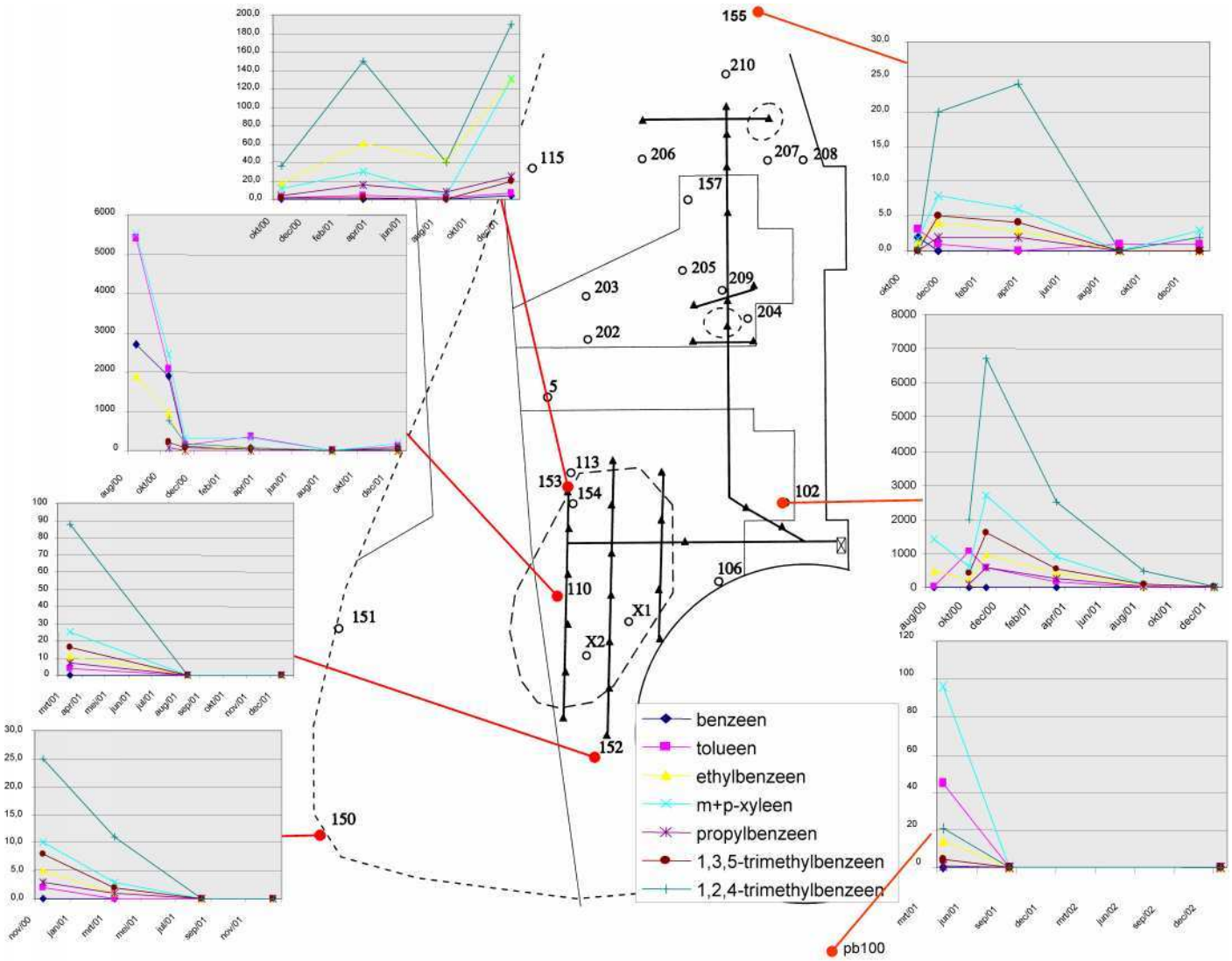
Tijdens de eerste meetcampagne (oktober 2000) werd een kernboring uitgevoerd tussen peilbuis 110 en 201. De bodemdieptes 145-200; 200-210; 225-265; 335-370 en 520-545 cm beneden maaiveld werden bemonsterd. In twee stalen rond grondwaterniveau werden oliecomponenten gedetecteerd in de grond (staal 200-210 cm-mv: ethylbenzeen: 0,25 mg/kg; xyleen:0,65 mg/kg; ipB…:0,70 mg/kg; pB: 4,0 mg/kg; sec. butylB:1,0 mg/kg; p-iso-pT: 2,8 mg/kg; n-heptaan: 0,50 mg/kg en n-octaan 4,6 mg/kg.; staal 225-265 cm-mv: TMB: 0,35 mg/kg). Diepere stalen bevatten geen aantoonbare gehalten aan BTEX en andere geanalyseerde componenten. Genoemde bodemstalen werden uitgeplaat op verschillende types voedingsmedia. De resultaten van de overeenkomstige bacterietellingen zijn weergegeven in tabel 36.

Tabel 36. Resultaten bacterietellingen (aantal per gram grond) in bodemstalen genomen t.h.v. pb 110-201.

Diepte (cm-mv.)	**Rijk H.M.** (1)	**M.M.+D**(2)	**M.M.+D +glucose**	**M.M.+D +tolueen**	**M.M.+D +TCE** (3)	**M.M.+D +DCA**(4)	**M.M.+D +BTEX**
150-200	$1,6\ 10^4$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$3,0\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$
225-265	$7,8\ 10^4$	$<1\ 10^2$	$2,0\ 10^3$	$1,0\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$
335-370	$1,7\ 10^4$	$<1\ 10^2$	$5,1\ 10^3$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$
520-545	$2,0\ 10^4$	$<1\ 10^2$	$5,7\ 10^3$	$7,0\ 10^3$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$	$<1\ 10^2$

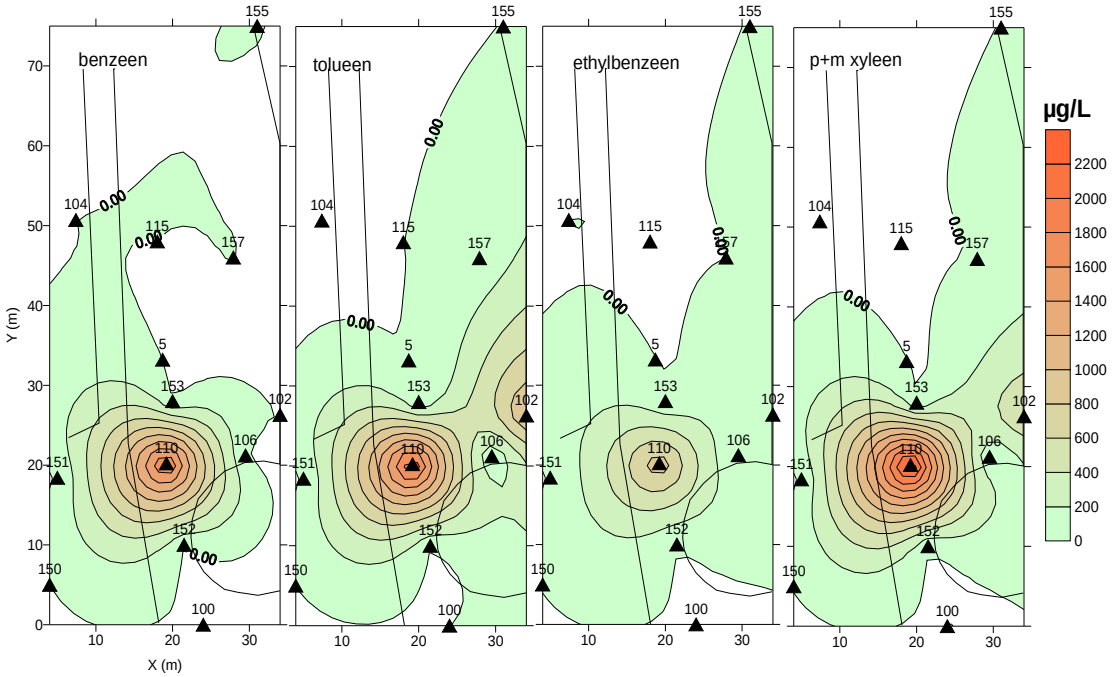
(1) heterotroof medium
(2) minimaal medium met Delvocid (fungicide)
(3) trichlooretheen
(4) dichloorethaan

Het aantal bacteriën dat voorkomt in de stalen is 10.000/g bij gebruik van rijk medium en 7000/g bij gebruik van tolueen als koolstofbron. Een normale humusrijke bodem bevat 10^6 à 10^9 bacteriën per gram; voor een dieper gelegen, humusarme horizont is 10^4 een normaal aantal. Tolueenafbrekers werden aangetoond; de tellingen lagen onder de detectielimiet ingeval van een BTEX cocktail als koolstofbron. Er zijn dus bacteriën aanwezig die kunnen groeien op aromaten, maar de aantallen zijn niet zeer groot.

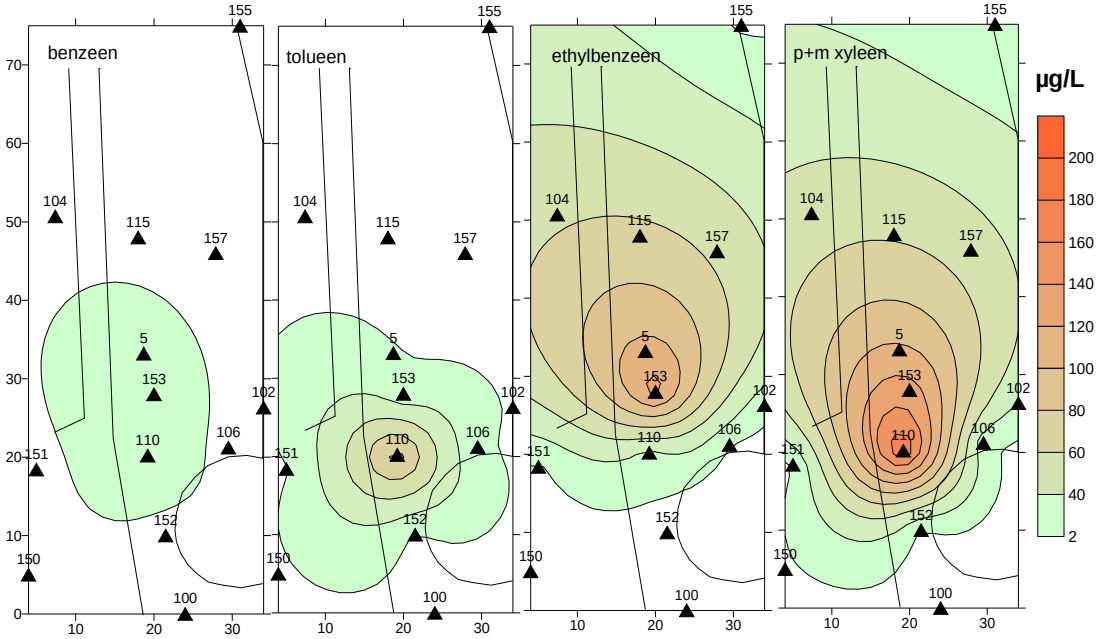


Figuur 9. Situatietekening met aanduiding van peilbuislocaties, spargepunten en de evolutie van de primaire BTEX-verontreinigingsparameters.

Beginsituatie (oktober 2000)



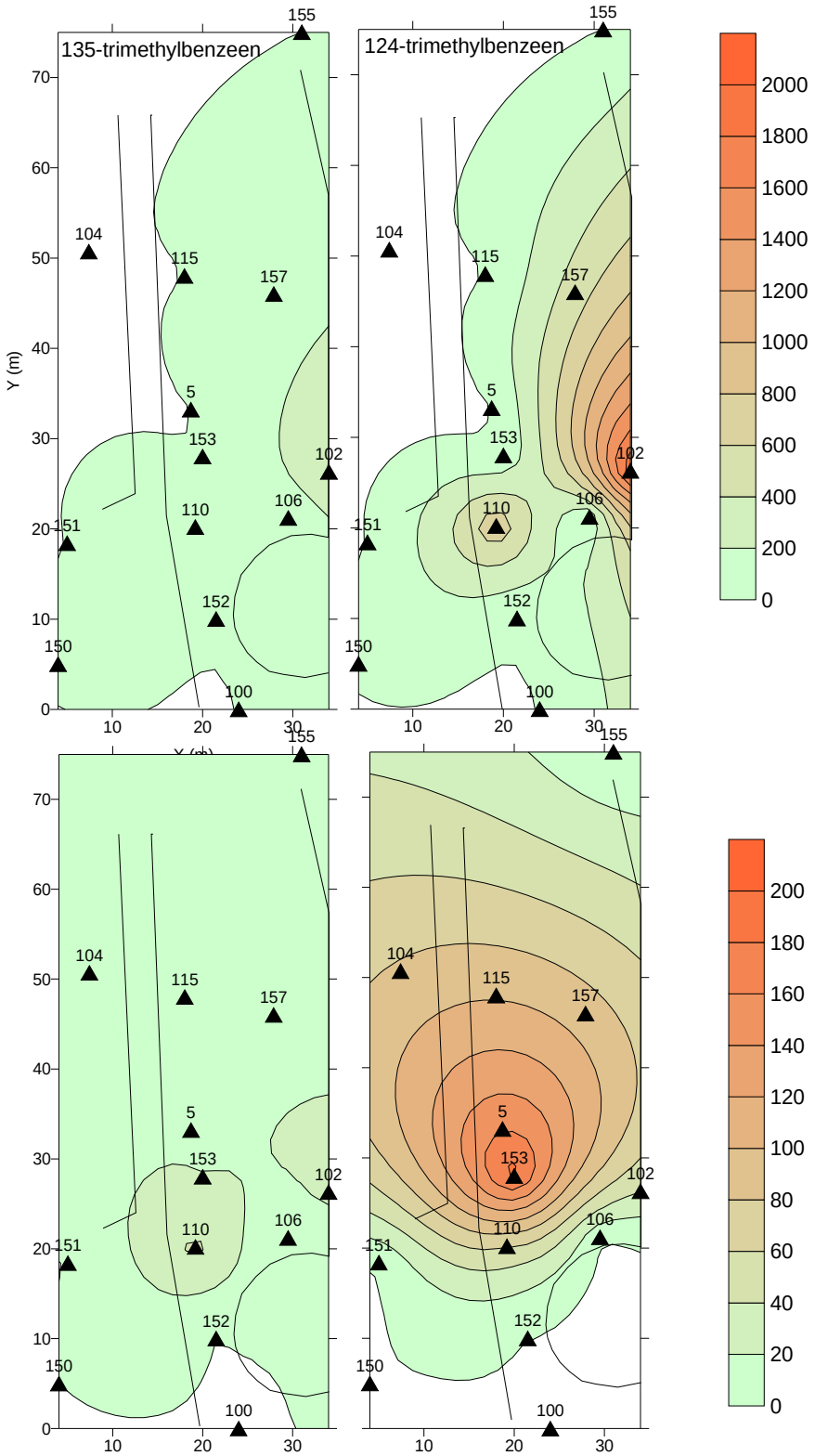
Eindsituatie (maart 2002)



Figuur 10. Met Surfer geïnterpoleerd beeld van de situatie (BTEX-concentraties in de monitoringspeilbuizen) bij het begin van de biospargingsanering t.o.v. het einde ervan.

OKT 2000:

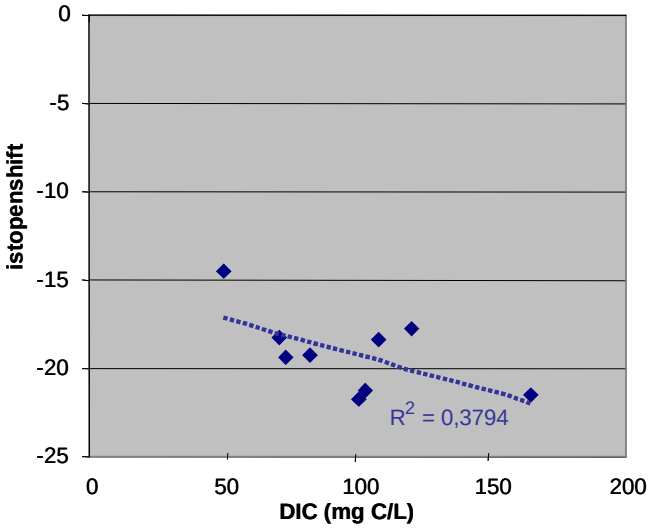
MRT 2002:



Figuur 11. Met Surfer geïnterpoleerd beeld van de situatie (trimethylbenzeen-concentraties in de monitoringspeilbuizen)bij het begin van de biospargingsanering t.o.v. het einde ervan (legende: gehalten in µg/L).

7.7.2 Analyse van stabiele koolstofisotopen ($^{13}C/^{12}C$)

Door het accumuleren van CO_2 afkomstig van biologische afbraak van olieproducten werd een *negatieve verschuiving* vastgesteld van $\delta^{13}C/^{12}C$ in functie van het gehalte aan anorganische opgeloste koolstof (figuur 12: nulsituatie). In het huidige project kon geen verdere daling in de tijd worden vastgesteld omdat de isotopenverhouding reeds bij aanvang sterk verlaagd was (-20,1 ‰ tegen normaal ca. -10 ‰). Dit kan worden toegeschreven aan het feit dat, voordat de bioremediatie werd gestart, reeds sprake was van natuurlijke attenuatie. Als dusdanig bleek de isotopenanalyse dus wel degelijk een geschikte parameter voor het aantonen van natuurlijke afbraak van BTEX, maar is een verdere opvolging van deze parameter tijdens het bioremediatieproces enkel aangewezen indien bij de start van de sanering nog geen duidelijke natuurlijke afbraak werd vastgesteld.



Figuur 12. Verband tussen de $^{12}C/^{13}C$ isotopenshift en het DIC-gehalte in de monitoringspeilbuizen.

7.7.3 Relatieve afbraaksnelheden aromaten

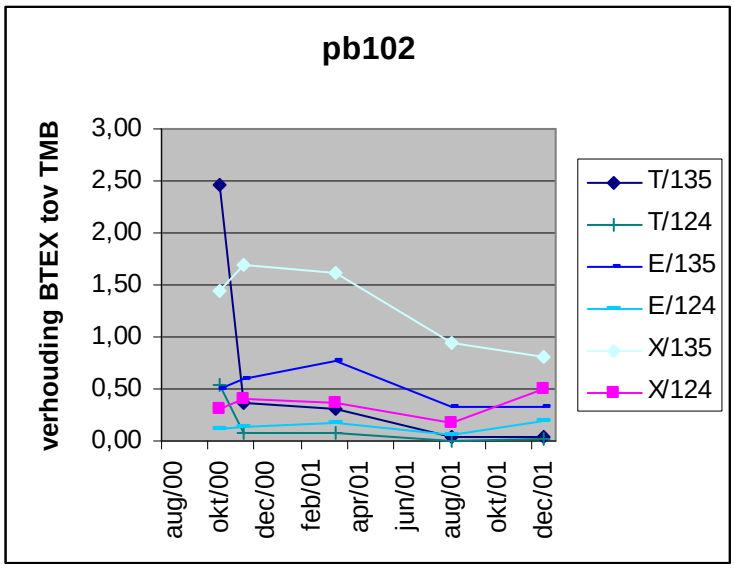
Sommige stoffen die voorkomen in verontreinigingen zoals ruwe olie, benzine of minerale olie zijn relatief moeilijk afbreekbaar. Door het volgen van hun concentratie in functie van de tijd en in verhouding tot andere verontreinigingen kan het verloop van de bioremediatie worden gevolgd. In voorliggend project kan men hiertoe volgende stoffen in beschouwing nemen:

- MTBE
- Trimethylbenzenen

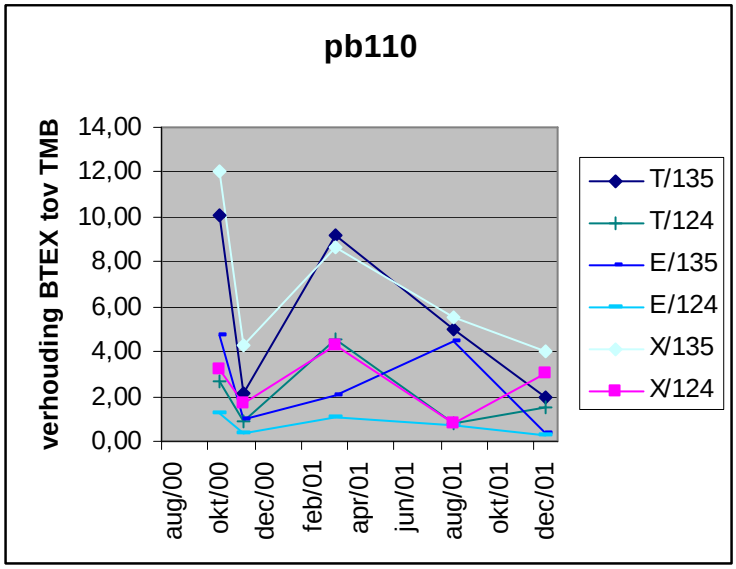
MTBE bleek enkel in peilbuis 110 in detecteerbare hoeveelheden voor te komen (89 µg/L). Reeds bij de tweede bemonsteringsdatum was het gehalte echter teruggelopen tot quasi 0. Als “biomerker” komt MTBE in dit geval dus niet in aanmerking. De verhouding BTEX/trimethylbenzenen blijkt wel relevant. In figuren 13 en 14 is het verband uitgezet voor peilbuizen 102 en 110.

Peilbuis 102: de verhouding daalt het sterkst voor tolueen, hetgeen in overeenstemming is met het gegeven dat tolueen het gemakkelijkst afbreekt van de BTEX. Voor de xylenen en tevens voor ethylbenzeen is er wel een daling t.o.v. 1,3,5 TMB, maar niet t.o.v. 1,2,4 TMB, hetgeen zou inhouden dat 1,3,5 het minst afbreekbaar is.

Peilbuis 110: deze peilbuis was aanvankelijk het sterkst verontreinigd met BTEX. Dit is een mogelijke verklaring voor het feit dat hier de verhouding tolueen/TMB pas op langere termijn daalt. Voor het overige wordt dezelfde vaststelling gedaan als voor pb 102.



Figuur 13. Verloop van de verhouding van de concentraties aan T, E en X t.o.v. de concentraties aan 1,3,5 TMB en 1,2,4 TMB voor peilbuis 102.



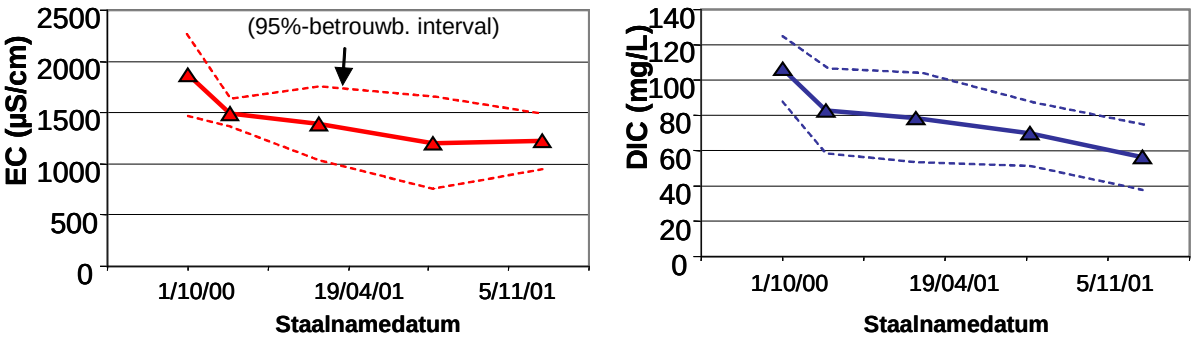
Figuur 14. Verloop van de verhouding van de concentraties aan T, E en X t.o.v. de concentraties aan 1,3,5 TMB en 1,2,4 TMB voor peilbuis 110.

7.7.4 Metabolieten

Voor BTEX-afbraak zijn de voornaamste tussenproducten fenolen. Deze stoffen zijn echter opzichzelf weer koolstofbronnen voor aërobe afbraak, en zullen dus in de loop van de biodegradatie terug moeten verdwijnen. Er wordt dus een tijdelijke verhoging verwacht van de fenolindex, die zou moeten verdwijnen zodra de oorspronkelijke polluenten (de vluchtige aromaten) grotendeels verdwenen zijn. Indien de DOC als groepsparameter zou kunnen dienen voor het meten van metabolieten die anders niet worden waargenomen in standaard analysepaketten, wordt een gelijkaardig verloop ervan verwacht in de loop van de tijd: een stijging bij de start van de biosparging, gevolgd door een daling op langere termijn. Voor de gevolgde site bleek de fenolindex in een reeks monitoringpeilbuizen reeds bij aanvang verhoogd, zoals eveneens werd vastgesteld voor de isotopenverhouding. Er werd geen duidelijke trend vastgesteld in het verdere verloop van de fenolindex: sommige peilbuizen vertoonden een stijgend gehalte, andere een dalend gehalte. Het gemiddeld DOC gehalte leek wel een aanvankelijk stijgende trend te vertonen, gevolgd door een daling, maar de variatie op de metingen was dermate groot dat de significantie hiervan eerder gering is.

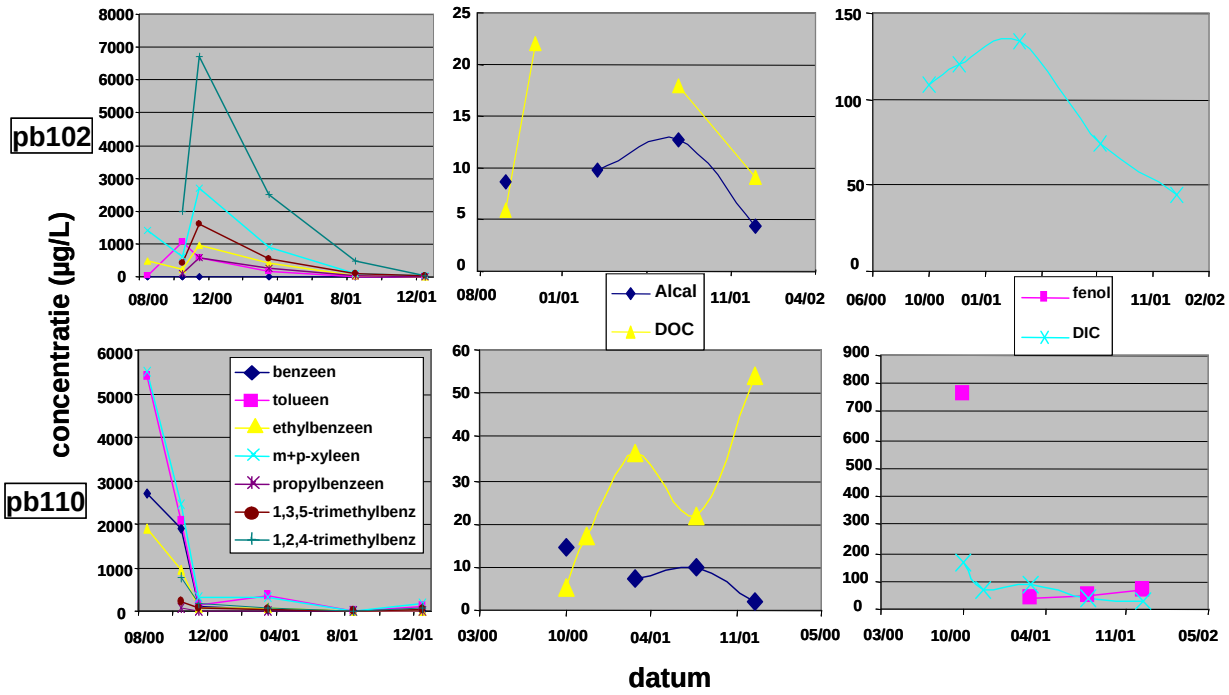
7.7.5 Alkaliniteit en geleidbaarheid van het grondwater

Als gevolg van biodegradatie wordt kooldioxide gevormd, dat wordt omgezet in koolzuur, bicarbonaat en carbonaat. Dit zou zich dan moeten uiten in een toename van de alkaliniteit na de start van de bioremediatie. Een zelfde verloop wordt verwacht van de elektrische geleidbaarheid. De pH zou theoretisch moeten dalen indien CO_2 wordt gevormd, door de vorming van koolzuur. Voor de gevolgde locatie bleek er echter een daling op te treden ifv de tijd voor wat betreft de parameters EC en DIC (figuur 15). Dit kan mogelijk worden verklaard door aan te nemen dat beide parameters reeds verhoogd waren bij aanvang (zoals voor de fenolindex en isotopenverhouding), en dat door de persluchtinjectie CO_2 uit de bodem werd verdreven.



Figuur 15. Gemiddeld verloop van de EC en van het DIC-gehalte in de monitoringspeilbuizen als functie van de tijd.

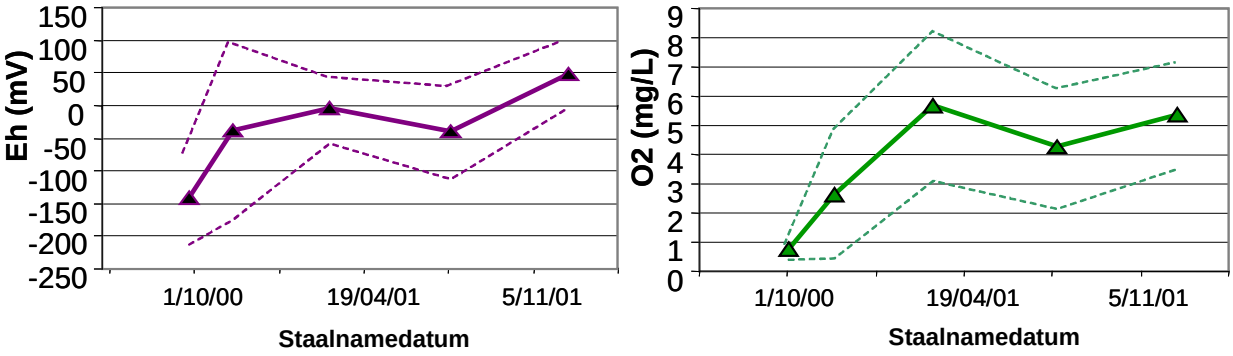
In figuur 16 wordt voor peilbuizen 102 en 110 het verloop weergegeven van de primaire verontreinigingsparameters (BTEX e.a.) en de secundaire parameters DOC, alkaliniteit, fenolindex en DIC.



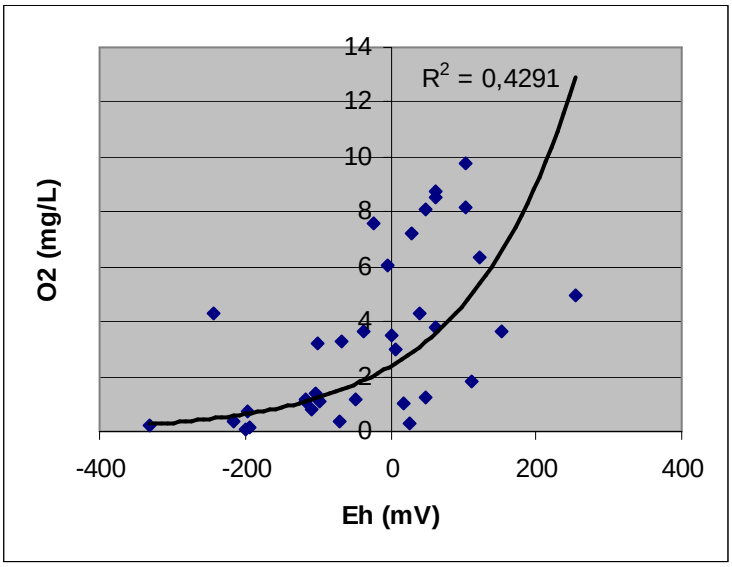
Figuur 16. Verloop van de parameters alkaliniteit, DOC, fenolindex en DIC als functie van het verloop van de primaire verontreinigingsparameters voor peilbuizen 102 en 110.

Redoxtoestand

De redoxtoestand van het grondwater tijdens de sanering werd opgevolgd d.m.v. de meting van de redoxpotentiaal en het zuurstofgehalte van het grondwater. Tijdens de sanering werd een gemiddelde stijging vastgesteld van beide parameters (figuur 17). Ook was er een vrij eenduidig verband tussen beide parameters (figuur 18).



Figuur 17. Verloop van de gemiddelde O_2-gehalten (links) en redoxpotentiaal (rechts) in de monitoringspeilbuizen als functie van de tijd. De verticale lijnen geven de standaard deviatie weer op de gemiddelden.



Figuur 18. Vastgesteld verband tussen de gemeten redoxpotentiaal en het zuurstofgehalte van het grondwater in de monitoringspeilbuizen.

7.7.6 Nutriënten

De gehalten aan nitraat (nutriënt en naast zuurstof een potentiële elektronacceptor), ammonium en nitriet werden eveneens mee opgevolgd. Ten slotte werd ook het fosfaatgehalte gevolgd (nutriënt). Voor geen van deze parameters werden significante verbanden aangetoond met het verloop van de primaire verontreinigingsparameters.

Genoemde parameters variëerden wel sterk met plaats en tijd. De oorzaak van deze variabiliteit was de dosering van stikstof en fosfaat door de aannemer tijdens de bioremediatie. Plaatselijk leidde dit tot overdoseringen van nitraat (zie analyseresultaten in o.a. tabel 22.

8 Appendix 2: bioremediatievoorbeeld 2

8.1 Samenvatting

Appendix 2 van dit rapport doet verslag van de opvolging van de sanering via bioremediatie op een locatie gelegen te Neerpelt. De verontreiniging op dit terrein (een voormalig oliedepot) bestaat uit minerale olie (diesel/stookolie). De sanering wordt uitgevoerd met een combinatie van bodemluchtextractie, persluchtinjectie, grondwaterextractie en infiltratie van nutriënten en bacteriën. De sanering is gestart in juni 2003 en loopt nog steeds.

Vito heeft de sanering opgevolgd vanaf de start tot eind 2004. Hiertoe werden regelmatig een reeks peilbuizen bemonsterd. Tevens werden twee mesocosmsystemen geplaatst waarmee de verontreinigingsevolutie in de bodemfase werd opgevolgd en waarin tevens de microbiologie werd opgevolgd. Daarnaast werden de tussentijdse evaluatieverslagen van het studiebureau dat de sanering opvolgt, bestudeerd en de resultaten mede gebruikt voor de evaluatie van het verloop van de sanering.

De operationele parameters (o.a. hoeveelheden onttrokken grondwater, bodemlucht, e.d.) werden niet door Vito gemonitoord maar opgevolgd via de tussentijdse rapporteringen van de begeleidende EBSD. Bij het opstellen van voorliggend rapport waren 4 voortgangsverslagen beschikbaar. Op dat moment was in totaal 162 m^3 grondwater onttrokken (gemiddeld 2 m^3/d) waarvan 144 m^3 na zuivering terug geïnfiltreerd (met nutriënten en bacteriën). 51756 m^3 bodemlucht werd onttrokken. De hoeveelheid geïnjecteerde lucht bedroeg volgens het laatste voortgangsrapport ca. 4 m^3/u per kern (discontinu).

Zowel de analyseresultaten van de bodem als deze van het grondwater zouden voorlopig doen besluiten dat er geen gunstige evolutie optreedt van de oliegehalten in de bodem.

De analyseresultaten van Vito tonen echter aan dat er wel een toename van de biologische olie-afbrekende activiteit in de bodem kan worden vastgesteld. De oliegehalten daalden in de mesocosms.

De schijnbaar ‘tegenvallende’ resultaten zijn mogelijk een gevolg van het feit dat in de kern van de verontreiniging wordt gemonitoord; in peilbuizen geplaatst in de oliesmeerzones kan zich na verloop van tijd pure olie verzamelen, zeker indien discontinue drukverschillen optreden door perslucht- en waterinjectie.

Anderzijds kan slechts bioremediatie van olie optreden in bodem die voldoende wordt doorspoeld (met lucht en water). Staalnames in de kern die nog weinig olieafbraak aantonen zijn mogelijk gelegen buiten de invloedzone van de in-situ sanering.

Tot slot wordt de bioremediatievariant getoest aan de criteria voor acceptatie zoals weergegeven in hoofdstuk 4 van dit document.

8.2 Achtergrondinformatie

De locatie betreft een voormalige opslagplaats van olieproducten in bovengrondse tanks. De verontreiniging werd beschreven in een BBO en BSP; ze bestaat uit voornamelijk zwaardere olietypes (diesel, stookolie). Er zijn twee

verontreinigingskernen aanwezig, waarvan de contourlijnen zijn weergegeven in figuur 20. De olie komt vooral ondiep voor onder maaiveld (het grondwater staat relatief ondiep onder maaiveld: 0,5 à 1 m-mv.). In de grond zijn oliegehalten gemeten van maximaal 30000 mg/kg ds bij de laadkaai (0,5-1,0 m-mv.) en van 24000 mg/kg ds in het tankenpark (0,5-1,0 m-mv.). In het grondwater werden gehalten gerapporteerd van maximaal 13000 µg/L en BTEX 100 µg/L.

De sanering wordt in-situ uitgevoerd zonder voorafgaandelijke verwijdering van de vroegere installaties (laadkaai, bovengrondse tanks, verharding). De verharding bestaat uit beton (plaatselijk beschadigd); in het tankpark ligt grind en is sterke begroeiing aanwezig. De installatie van het saneringssysteem werd aangevangen in juni 2003. De zuiveringseenheid bestaat uit pompen, olie/waterafscheider en dubbel biofilter. Het systeem is PLC-gestuurd met alarmvoorzieningen op de belangrijkste onderdelen.

Bij controle van de aanwezige peilbuizen bleken de meeste nog intact en bruikbaar; een groot aantal is echter van het mini-filter type (25 mm); dit is ongunstig voor opvolging van de sanering omdat deze filters slechts beperkt water geven. Daardoor is het toegestane bemonsteringsdebiet erg klein en kunnen gevoelige parameters zoals zuurstof, redox en temperatuur minder nauwkeurig worden bepaald.

8.2.1 Controle en bemonstering van enkele relevante peilbuizen

In juni 2003 werden acht peilbuizen gepeild, werden de veldparameters bepaald en 5 ervan bemonsterd ter bepaling van het oliegehalte en –fractionering (tabel 38). Peilbuislocaties zijn weergegeven in figuur 20. Tabel 37 geeft de resultaten van de veldwaarnemingen. De redoxpotentiaal en de zuurstofgehalten, met name nabij de verontreinigingskernen, zijn sterk verlaagd (hetgeen reeds een zekere natuurlijke afbraak suggereert die wordt gelimiteerd door een tekort aan zuurstof). Peilbuis E35 bleek sterk verontreinigd (indicaties van drijflaag) maar bevindt zich buiten de saneringszone.

Tabel 37. *Veldparameters grondwater – juni 2003*

Peilbuis	Diepte (m-mv.)	Waterstand (m-mv.)	EC (µS/cm)	pH	ORP (mV)	O_2 (mg/L)	T (°C)
E62 (40mm)	3,95	0,56	435	6,31	-43	0,60	13,2
	Opm.: roestkleuringe neerslag. Helder na schoonpompen.						
E35 (40 mm)	*Sterke oliegeur (drijflaag; niet bemonsterd)*						
E61 (25mm)	1,80	0,50	308	5,95	-200	0,79*	18,5*
	Opm.: zwart bezinksel in peilbuis; oude oliegeur; peilbuis leeggezogen tijdens opmeting veldparameters. Grondwater is grijs-troebel.						
17 (50 mm)	3,05	0,37	481	6,46	-82	0,77	14,2
	Opm.: roestkleurige neerslag; muffe geur. Helder na schoonpompen.						
E6 (25 mm)	3,25	0,65	284	6,41	-90	0,78	14,4
	Helder						
E14 (25 mm)	3,20	0,78	439	6,00	-163	1,50*	17,5*
	Opm.: zwart bezinksel in peilbuis; oude oliegeur; peilbuis leeggezogen tijdens opmeting veldparameters. Grondwater grijs-troebel						
E25 (25 mm)	3,89	0,70	585	6,47	-204	1,25*	16,8*
	Opm.: zwart bezinksel in peilbuis; oude oliegeur. Grondwater grijs-troebel						

* Minder accuraat wegens gering haalbaar debiet

Tabel 38. *Analyseresultaten minerale olie*

Peilbuis	Olie C10-C40 (GC/FID - µg/L)
E62	<50
E6	<50
E14	<50
E25	200
17 (50 mm)	<50

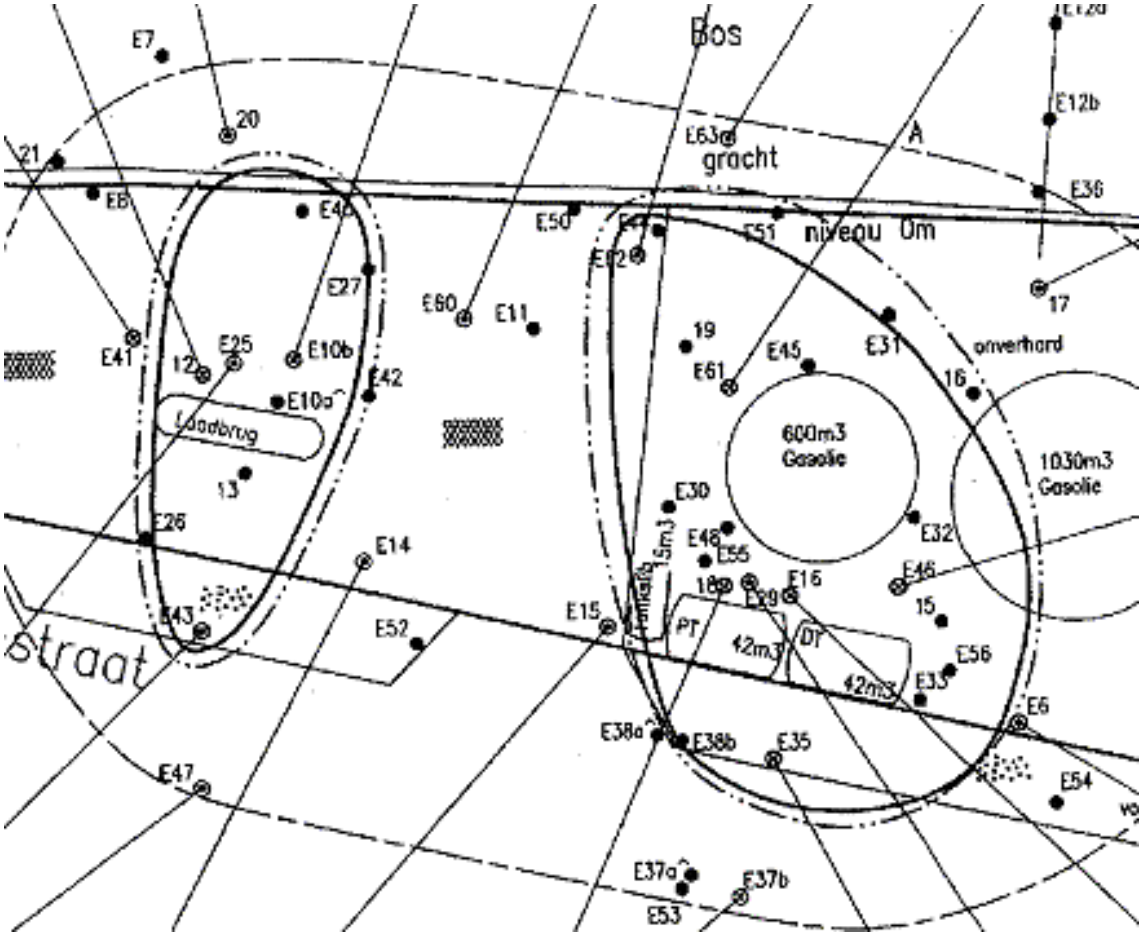
8.2.2 Saneringssysteem

Het saneringssysteem bestaat uit een aantal verticale filters voor bodemluchtextractie, persluchtinjectie, grondwateronttrekking en grondwaterinjectie (na zuivering en toevoeging van nutriënten en een bacteriecultuur) (tabel 39; figuur 19).

Tabel 39. *Saneringssysteem*

Filters	Aantal, laadbrug	Aantal, tankpark
Combifilters BLE en grondwateronttrekking 3 m-mv	12	16
Dubbele injectiefilters voor water op 0,75 m-mv en perslucht op 4 m-mv.	8	9
Bodemluchtextractiefilters 1 m-mv.	1	1

Figuur 19. *Overzichtsfoto van het geïnstalleerde saneringssysteem (laadkaai)*



Figuur 20. Peilbuislocaties en verontreinigingssituatie grondwater ten tijde van het BBO (tekening overgenomen uit BSP)

8.3 Plaatsing mesocosms

Op 17 juli 2003 werden door Vito 2 mesocosms geïnstalleerd. Dit zijn 63 mm peilbuizen met filterlengte 1,3-2,8 m-mv. Per peilbuis, zijn 5 aquiferstaalhouders aangebracht. Dit zijn geperforeerde houders uit kunststof waarin opgepulst/opgeboord aquifermateriaal uit de oliesmeerlaag wordt ingebracht na homogenisering (slurry). Van de slurry gebruikt voor de vulling van de mesocosms werd tevens 1 L meegenomen naar Vito. Na substaalname voor uitplating (zie verder) werden deze stalen ingevroren (-80°C) voor latere analyses op olie GC/FID, PAK, OS, pH, d.s., DGGE (vergelijken met DGGE van injectiebacteriecultuur, verkregen via aannemer).

Tijdens de plaatsing van de mesocosms werden 2 bijkomende grondstalen genomen ter hoogte van het grondwaterniveau; één per verontreinigingskern. Deze werden zoals met de grond van de mesocosms ingevroren op Vito voor latere analyses (zelfde analyses op deze monsters als op grond mesocosms + biobeschikbaar ijzer(II), sulfide). Enkel een substaal per grondstaal werd apart gehouden voor uitplatingen (zie verder).

Tijdens de plaatsing van de mesocosms en de boringen bleek de bodem zeer heterogeen: grof zand wisselt af met kleiige en venige lagen.

De mesocosm-peilbuizen werden na plaatsing afgewerkt aan de bovenzijde met grote bentonietstop, mortelcement en straatpot, dit om kortsluitstromen te voorkomen.

Na plaatsing en afwerking werden de mesocosmpeilbuizen schoongepompt tot helder (ca. 50L per peilbuis). Vervolgens werden volgende veldparameters gemeten: waterstand, EC, pH, ORP, O2. Daarna werden de mesocosmsocks in de buizen gehangen en werden de peilbuizen afgesloten (dop en straatpot). Aansluitend werden de mesocosmpeilbuizen bemonsterd: 1 L fles groen/bruin glas per mesocosm. De veldgegevens tijdens deze bemonstering zijn weergegeven in tabel 40.

Kiemtellingen totaal olieafbrekers. Uitplatingen werden voorzien van volgende stalen:

- Grondstalen mesocosms (2 stuks)
- Bijkomende grondstalen (2 stuks)
- Grondwaterstalen (2 stuks)

Tabel 40. Veldgegevens Mesocosmpeilbuizen (dag van plaatsing – 17/7/03)

	Meso 1 (tankenpark)	**Meso 2 (laadkaai)**
Totale lengte (m –mv.)	2,8	2,8
Filterdeel (m)	1,3-2,8	1,3 – 2,8
Waterstand na plaatsing (m-mv.)	0,79	0,98
EC (µS/cm)	432	671
PH	6,6	6,6
ORP (mV)	-41	-83
O_2 (mg/L)	0,07	0,13

8.4 Oliekarakterisatie

Op de locatie is in mei 2004 aanvullend een grondmonsters genomen binnen de olie-verontreinigde zone (nabij B2). Op dit staal werd een OK-oliekarakterisatie uitgevoerd met behulp van de nieuwe 'OK' oliekarakterisatiemethode ontwikkeld door Vito en TTE. Deze analyse staat toe een gedetailleerd beeld te verkrijgen van de aard en het gedrag van de olie aanwezig in een grondmonster: de samenstelling, vluchtigheid en wateroplosbaarheid en daarmee tevens de humane risico's, biologische afbreekbaarheid en verspreidingsrisico's. De basis van de analyse is een kolomexperiment, waarin het verontreinigd grondmonster in evenwicht wordt gebracht met water (recirculatie van water over de kolom gedurende 6 uur, waarbij de maximale oplosbaarheid (evenwichtsconcentratie) van het oliemengsel in de waterfase wordt bereikt). Vervolgens wordt de waterfase én de oliefase geanalyseerd met GC-FID, na voorafgaandelijke splitsing van de olie in een alifatische en aromatische fractie (silicakolom).

8.4.1 Oliegehalte en samenstelling (alifaten/aromaten en stofgroepen)

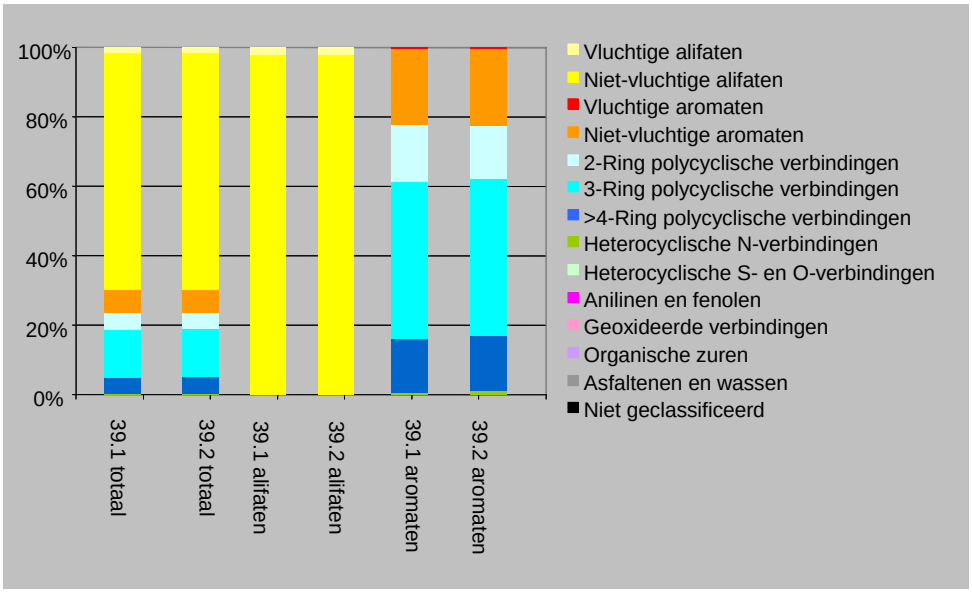
Het gehalte aan olie in het bodemmonster bedraagt ca. 18000 mg/kg d.s. De olie bestaat voor circa 70% uit alifaten en 30% uit aromaten (tabel 41). De alifaten zijn bijna geheel niet-vluchtige alifaten. De aromaten bestaan grotendeels uit polycyclische verbindingen waarvan het grootste deel 3-ring polycyclische verbindingen zijn. De samenstelling naar stofgroepen is weergegeven in tabel 42 en figuur 21.

Tabel 41. Samenstelling naar stofgroepen van de olie in het grondstaal. Tevens zijn de deelfracties aromaten en alifaten voor beide monsters weergegeven.

conc. totaal mg/kg ds	conc. alifaten mg/kg ds	conc. aromaten mg/kg ds
18000	12500	5500

Tabel 42. Samenstelling naar stofgroepen van de olie. Tevens zijn de deelfracties aromaten en alifaten voor beide monsters weergegeven.

Stofgroep	totaal	alifaten	aromaten
Vluchtige alifaten	1,6	2,3	0,0
Niet-vluchtige alifaten	68,0	97,7	0,0
Vluchtige aromaten	0,1	0,0	0,4
Niet-vluchtige aromaten	6,6	0,0	21,7
2-Ring polycyclische verbindingen	5,0	0,0	16,6
3-Ring polycyclische verbindingen	13,7	0,0	45,0
>4-Ring polycyclische verbindingen	4,7	0,0	15,5
Heterocyclische N-verbindingen	0,2	0,0	0,7
Heterocyclische S- en O-verbindingen	0,0	0,0	0,0
Anilinen en fenolen	0,0	0,0	0,0
Geoxideerde verbindingen	0,0	0,0	0,0
Organische zuren	0,0	0,0	0,0
Asfaltenen en wassen	0,0	0,0	0,0
Niet geclassificeerd	0,0	0,0	0,0
Totaal	100	100	100



Figuur 21. Samenstelling naar stofgroepen van de olie**.** Tevens zijn de deelfracties aromaten en alifaten weergegeven (duplo bepaling).

Via dezelfde OK-analyse kan deze diesel ook worden beschreven via de TPH fractie-indeling. Dit is weergegeven in tabel 43.

Tabel 43. Samenstelling van de olie naar TPH fracties.

Fractie	alifaten		**fractie**	Aromaten
C_5-C_6	0,0		C_5-C_7	0,0
C_6-C_8	0,1		C_7-C_8	0,0
C_8-C_{10}	2,1		C_8-C_{10}	0,4
C_{10}-C_{12}	10,1		C_{10}-C_{12}	9,4
C_{12}-C_{16}	34,3		C_{12}-C_{16}	27,0
C_{16}-C_{21}	37,4		C_{16}-C_{21}	56,7
C_{21}-C_{35}	15,9		C_{21}-C_{35}	6,6
>C_{35}	0,0		>C_{35}	0,0
Totaal	100,0			100,0

De **evenwichtsconcentratie** van de olie, zoals bepaald in het kolomrecirculatieexperiment bedraagt 2000 à 3000 µg/L (d.i. de maximale wateroplosbaarheid van de olie op het moment van het experiment. Als de samenstelling van de olie op termijn wijzigt, kan ook de evenwichtsconcentratie en de samenstelling van de waterfase wijzigen).

Oliegehalten gemeten in peilbuizen, die beduidend hoger zijn dan het genoemde gehalte van 2000 à 3000 µg/L, zijn geen 'evenwichtsgehalten' maar wellicht een gevolg van het meebemonsteren van puur product (oliefilm) tijdens de grondwaterbemonstering (zie verder).

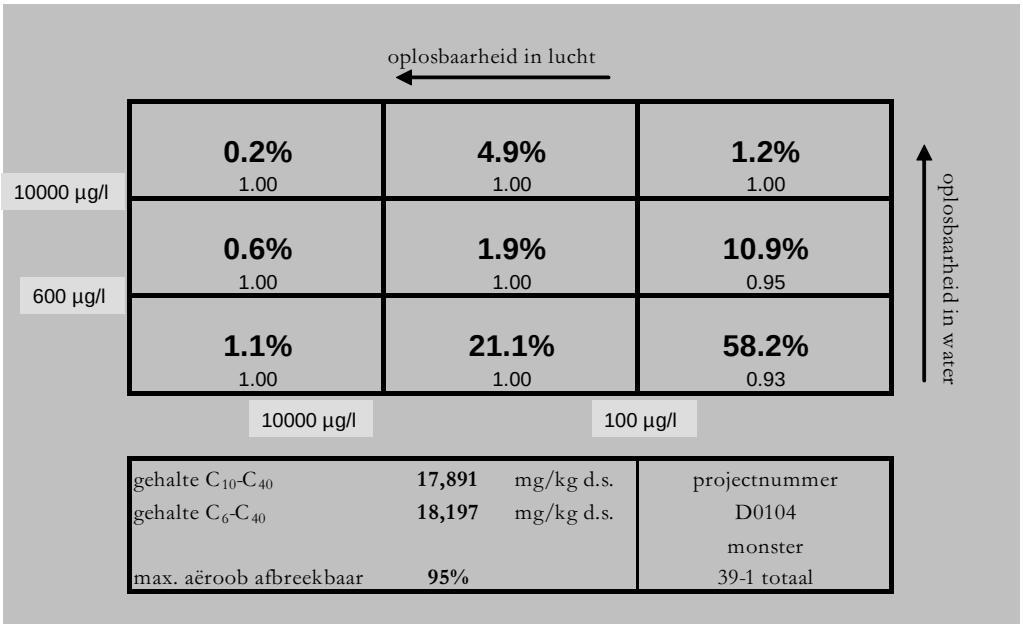
8.5 Gedrag van de olie en voorspelde saneerbaarheid

In tabel 44 zijn gemiddelde waarden weergegeven van relevante fysico-chemische parameters per waargenomen stofgroep in de olie.

Tabel 44. Voorspelde fysico-chemische parameters van de olie

Stofgroep	**Fractie** (%)	*M* ***Molecuul-gewicht*** (g/mol)	**S** Waterop-losbaar-heid (□g/l)	*Vp* ***verzadigde dampspanning*** (Pa)	**LogK_{ow}** octanol-water verdelings-coëfficiënt
Vluchtige alifaten	1,6%	136	2.248	840	4,84
Niet-vluchtige alifaten	68,0%	245	0	7,0	8,94
Vluchtige aromaten	0,1%	123	90.012	310	3,74
Niet-vluchtige aromaten	6,6%	159	17.823	27	4,56
2-Ring polycyclische verbindingen	5,0%	158	10.409	1,2	4,68
3-Ring polycyclische verbindingen	13,7%	183	4.488	0,1	5,08
>4-Ring polycyclische verbindingen	4,7%	217	2.051	0,0	5,79
Heterocyclische N-verbindingen	0,2%	145	70.058	1,4	3,72
Heterocyclische S- en O-verbindingen	0,0%	-	0	-	-
Anilinen en fenolen	0,0%	-	0	-	-
Geoxideerde verbindingen	0,0%	232	12.506	0,0	3,99
Organische zuren	0,0%	-	0	-	-
Asfaltenen en wassen	0,0%	416	0	0,0	17,25
Niet geclassificeerd	0,0%	-	0	-	-

Uit tabel 44 volgt dat het grootse deel van de olie in het onderzochte bodemstaal, een erg hoge Kow heeft (dus relatief hydrofoob) en een sterke retardatie in de bodem. De in het grondwater opgeloste olie is dus zeer weinig mobiel. Dit stemt overeen met de vaststelling dat er geen sprake is van een grondwaterpluim en eveneens met de vastgestelde zeer geringe wateroplosbaarheid van de olie). Op basis van de samenstelling van de olie en de andere gegevens in tabel 44 kan de z.g. *saneringsmatrix* worden opgesteld (figuur 22).



Figuur 22. Saneringsmatrix van de olie op de saneringslocatie

Uit deze matrix volgt dat het grootste deel van de olie (58%) slecht wateroplosbaar is (<600 µg/L) en niet vluchtig (<100 µg/L).

De theoretische bio-afbreekbaarheid is weergegeven in tabel 45. Hieruit blijkt dat de meeste olie matig snel aëroob afbreekbaar is, en ca. 5% niet-afbreekbaar. In het beste geval kan het grondgehalte van 20000 mg/kg dus worden gereduceerd tot 1000 mg/kg d.s. Dit is in overeenstemming met eerder uitgevoerde slurry-afbraaktesten (resultaten niet opgenomen in dit rapport), die aangaven dat de oliegehalten door microbiële afbraak ongeveer kunnen worden teruggebracht tot 1200 à 1700 mg/kg ds.

Tabel 45. Aërobe biologische afbreekbaarheid onder optimale omstandigheden

snel	matig	Slecht	Niet
11.8%	83.5%	0.0%	4.7%

8.6 Resultaten veldopvolging

8.6.1 Bemonstering en analyses mesocosms

Nulbemonstering (juli 2003). Resultaten van de uitgevoerde ‘nulbemonstering’ in juli 2003 zijn weergegeven in tabellen 46 en 47.

Tabel 46. Aquiferanalyses juli 2003

	B1	B2	B3	B4
ds (%)	**81,58%**	**81,09%**	**81,12%**	**82,13%**
os (%)	**0,714%**	**0,416%**	**0,505%**	**0,940%**
AVS (mg S2-/kg ds)	**2,4**	**3,3**	**<1,5**	**7,6**
Biobeschikbaar Fe (mg/kg ds)	**1228**	**1000**	**642**	**1067**
minerale olie (mg/kg ds)	**1045**	**1570**	**1087**	**1026**
Som PAKs (mg/kg ds)	**1,004**	**9,538**	**1,341**	**4,905**
naftaleen	0,05	0,364	0,133	0,833
benzo(a)anthraceen	0,014	0,046	NG*	NG*
benzo(a)pyreen	0,02	0,016	NG*	NG*
benzo€pyreen	0,016	0,017	NG*	NG*
benzo(ghi)peryleen	0,018	NG*	NG*	0,014
chryseen	NG*	0,099	NG*	0,053
dibenzo(a,h)anthraceen	NG*	NG*	NG*	0,093
fenanthreen	0,661	5,804	0,9155	2,468
fluorantheen	0,115	0,211	0,0915	0,194
fluoreen	0,082	2,439	0,168	1,079
indeno(1,2,3,cd)pyreen	NG*	0,012	NG*	NG*
pyreen	0,028	0,53	0,033	0,171

*NG: niet gedetecteerd

Tabel 47. Grondwater analyses juli 2003

	B3 (meso 1)	B4 (meso 2)
pH	6,6	6,6
DOC (mg C/l)	17	48
DIC (mg C/l)	39	90
DC (mg C/l)	56	138
NH_4^+ (mg/l)	<0,2	<0,2
NO_3^- (mg/l)	<0,5	0,7
PO_4^{3-} (mg/l)	<0,5	<0,5
minerale olie (µg/l)	2000	3000

Bemonstering en analyses van de mesocosmes/grondwater in peilbuizen B3 en B4 in functie van tijd. De mesocosms werden op regelmatige tijdsstippen bemonsterd door Vito, alsook het grondwater uit de peilbuizen waarin zich de mesocosms bevinden. De resultaten van deze analyses zijn weergegeven in onderstaande tabellen.

Tabel 48. Evolutie van parameters geanalyseerd op mesocosme stalen in B3 (meso 1)

Tijd (dagen)	0	132	215	306	397	495
ds (%)	0,8112	0,8613	0,8497	0,8691	0,8718	0,8687
os (%)	0,0051	0,0072	0,0057	0,0057	0,0056	0,0053
AVS (mg S^{2-}/kg ds)	<1,5	<2,3	<2,3	<2	<1,92	1,92
Biobeschikbaar Fe (mg/kg ds)	642	NB*	NB*	<200	337,5	<200
minerale olie (mg/kg ds)	1087	63	89	152	< DL	310
PAKs (mg/kg ds)	1,341	0,442	0,404	0,32	1,53	NB*

*NB: niet bepaald

Tabel 49.: Evolutie van parameters geanalyseerd op mesocosme stalen in B4 (meso 2)

Tijd (dagen)	0	132	215	306	397	495
ds (%)	0,8213	0,9091	0,8461	0,8505	0,8538	0,8629
os (%)	0,0094	0,0100	0,0095	0,0093	0,0099	0,0074
AVS (mg S^{2-}/kg ds)	7,6	<2,2	<11,7	8,3	6,4	128,3
Biobeschikbaar Fe (mg/kg ds)	1067	NB*	NB*	<200	564,7	<200
minerale olie (mg/kg ds)	1026	1582	1829	978	307	1193
PAKs (mg/kg ds)	4,905	2,243	1,66	0,853	0,53	NB*

*NB: niet bepaald

Tabel 50. Evolutie van parameters geanalyseerd in grondwater monsters uit peilbuis B3

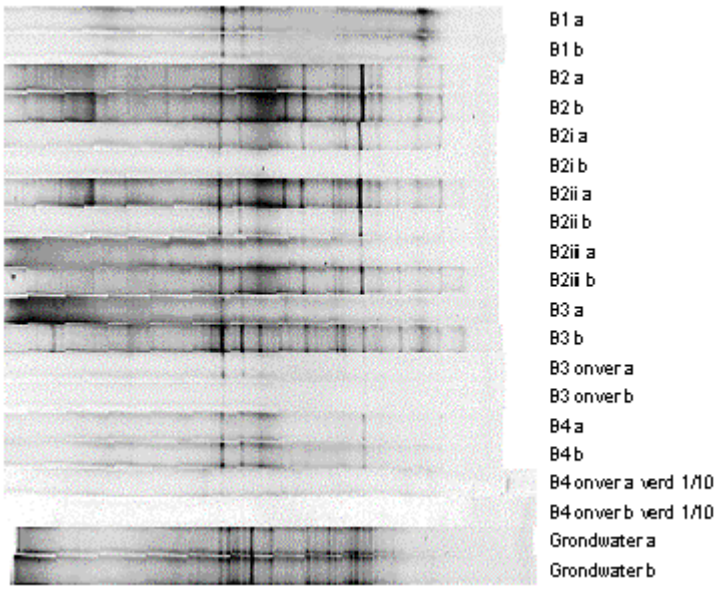
Tijd (dagen)	0	132	215	306	397	495
minerale olie (mg/l)	2	0,25	<0,1	<0,1	0,42	<0,1
pH	6,60	6,51	6,75	6,75	6,98	6,93
DOC (mg C/l)	17	12	8	16	10	8
DIC (mg C/l)	39	7	14	13	19	15
NH_4^+-N (mg/l)	<0,2	6	0,396	1,48	1,55	0,177
NO_3^--N (mg/l)	<0,5	2,42	<0,226	<0,226	<0,1	<0,226
PO_4^{3-}-P (mg/l)	<0,5 (0,2)	2,48	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15

Tabel 51.: Evolutie van parameters geanalyseerd in grondwater monsters uit peilbuis B4

Tijd (dagen)	0	132	215	306	397	495
minerale olie (mg/l)	3	0,52	<0,1	<0,1	0,17	<0,1
pH	6,60	6,58	6,69	6,69	6,89	6,63
DOC (mg C/l)	48	106	116	27	40	12
DIC (mg C/l)	90	114	54	21	37	19
NH_4^+-N (mg/l)	<0,2	13,2	3,98	0,151	1,67	0,274
NO_3^--N (mg/l)	0,7	<0,226	0,813	1,36	<0,1	0,48
PO_4^{3-}-P (mg/l)	<0,5 (0,2)	<0,15	<0,15	0,36	<0,15	<0,15

8.6.2 Microbiële populatie analyse van mesocosms in functie van tijd

De eubacteriële heterotrofe microbiële populatie aanwezig in bodemstalen genomen uit de onverzadigde (B3 en B4 onver; 0,5 tot 1 m-mv) en verzadigde zone (B1, B2, B3, en B4; 1 tot 3 m-mv) werd geanalyseerd via PCR-DGGE door gebruik te maken van een algemene eubacteriële primerset (GC63f-518r). Analyse van de DGGE (figuur 23) toont dat een gelijkaardige microbiële populatie aanwezig is in de duplicaat stalen, hetgeen wijst op de goede reproduceerbaarheid van de methode PCR-DGGE. Wanneer de populatie aanwezig in de bodemstalen B2 bekeken wordt op verschillende dieptes (B2, B2i, B2ii, B2iii) blijkt een stabiele populatie aanwezig die weinig varieert met de diepte. Wanneer de totale eubacteriële populatie van onverzadigde bodemstalen (B3 en B4 onver) vergeleken wordt met deze afkomstig van de overeenkomstige bodemstalen maar dan uit de verzadigde zone (B3 en B4) blijkt een minder diverse populatie aanwezig in de onverzadigde bodemstalen. Mogelijk is de concentratie aan minerale olie hier hoger dan in de verzadigde bodemstalen waardoor een minder diverse populatie aanwezig is. Uit microbiële tellingen op mineraal medium met olie als koolstofbron (tabel 52) blijkt inderdaad dat voornamelijk in B4 een hoog aantal olie-afbrekers werd waargenomen. Uit PCR analyses van deze onverzadigde stalen bleek inderdaad dat inhibitie optrad wanneer geen verdunde DNA extracten van de bodemstalen werden gebruikt. Analyse van de microbiële populatie in de bodemstalen van de 4 verschillende locaties (B1, B2, B3 en B4) toont dat er weinig verschil aanwezig is in het bandenpatroon en dus weinig variatie in de microbiële populaties aanwezig in de verschillende bodemstalen.



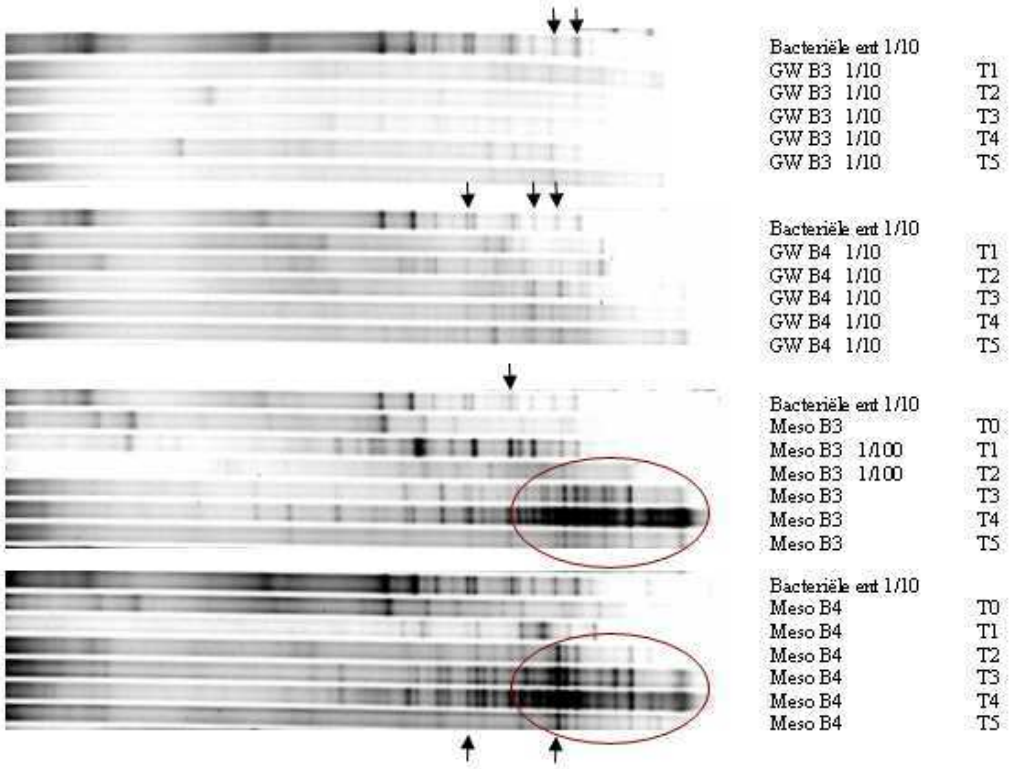
Figuur 23. Analyse van de eubacteriële microbiële populatie in de bodem stalen afkomstig van de onverzadigde en verzadigde zone B1, B2, B3 en, B4. Stalen a en b zijn stalen geanalyseerd in tweevoud; Labels i, ii en iii verwijzen naar B2 bodemstalen afkomstig van verschillende dieptes respectievelijk 1-1,2 m-mv, 1,3-1,4 m-mv, en 1,4-1,5 m-mv. Staal B2 is een mengstaal van deze 3 verschillende dieptes.

Tabel 52. Heterotrofe en olie-afbrekende CFU in verzadigde en onverzadigde bodemstalen B1, B2, B3 en B4 op T0 (juli 2003)

	Heterotrofe CFU/g grond of CFU/ml *	olieafbrekende CFU/g grond
B1	6,10E+04	<200
B2	6,10E+04	<200
B3 onver	4,50E+04	<200
B3	3,55E+05	4,10E+03
B3 GW*	5,90E+03	<20
B4 onver	3,25E+06	2,02E+04
B4	<3,0E+03	<200
B4 GW*	3,60E+03	<20

* CFU/ml bepaald in grondwater (GW) stalen

Zowel het aantal totale heterotrofe bacteriën als het aantal olie-afbrekers aanwezig in zowel de verzadigde als de onverzadigde bodemstalen werd bepaald via CFU tellingen. In het algemeen werd slechts een klein aantal heterotrofen geteld (< 10^6 CFU/g grond) en slechts zeer weinig olie-afbrekers. Echter in alle 4 bodemstalen (B1, B2, B3 en B4) werden slechts lage concentraties minerale olie gemeten (~ 1500 mg/kg ds of lager).



Figuur 24. Analyse van de eubacteriële microbiële populatie in de oorspronkelijke aquifer stalen afkomstig van de verzadigde zone B3 en B4 en respectievelijke mesocosmes in functie van tijd. GW, grondwater; Meso, mesocosme stalen; Mesocosmes werden geoogst en geanalyseerd op de aanwezige eubacteriële microbiële populatie op T0 (0 dagen), T1 (na 132 dagen), T2 (na 215 dagen), T3 (na 306 dagen), T4 (na 404 dagen) , en op T5 (na 495 dagen).
Analyse van de eubacteriële populatie aanwezig op de bodemstalen in de mesocosms toont een aanrijking van een populatie met hoog GC% (banden links op de gel in figuur 24 komen overeen met DNA fragmenten met laag GC gehalte

terwijl stalen rechts op de gel overeenkomen met DNA fragmenten bestaande uit hoog GC gehalte) zoals aangeduid door de cirkels in functie van de tijd. De aanwezigheid van minerale olie gaat vaak gepaard met de aanwezigheid of aanrijking van gram-positieve bacteriën met hoog GC gehalte (o.a. *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp.) die gekend zijn voor afbraak van water onoplosbare koolwaterstoffen. Een aantal van de banden (aangeduid met pijlen) uit het profiel van de olie-afbrekende bacteriële ent die gebruikt werd om het grondwater te beënten en op deze manier bioaugmentatie te induceren zijn terug te vinden in de profielen van zowel grondwater als bodemstalen aanwezig in mesocosms. Dit zou kunnen betekenen dat een aantal stammen uit het consortium dat gebruikt werd om olie afbraak te stimuleren zich onderhouden in het grondwater en/of vasthechten op het bodemmateriaal aanwezig in de mesocosmes, en dus competitief zijn met de endogene populatie en overleven in de bodem.

8.6.3 Staalname grondwater uit peilbuizen en mesocosms

Veldwaarnemingen grondwater. De veldwaarnemingen tijdens de bemonsteringen door Vito zijn weergegeven in tabel 53. Uit deze gegevens blijkt dat er een globale stijgende tendens kan worden waargenomen in de redoxpotentiaal en zuurstofgehalten, hetgeen wijst op een detecteerbare invloed van de persluchtinjectie. Tevens lijkt de pH gemiddeld te stijgen (hetgeen echter niet werd verwacht: bij bioremediatie van olie worden zuren en kooldioxide gevormd die normaal aanleiding geven tot een daling van de pH). In de overige parameters zit geen trend.

Tabel 53. Veldparameters

			pH			
	0	162	245	336	427	525
B3	6,60	6,51	6,75	6,87	6,98	6,93
B4	6,60	6,58	6,69	6,49	6,89	6,63
E25	6,47	6,58	6,75	6,59	6,84	6,66
E61	5,95	5,1	5,17	5,89	5,85	6,24
E6	6,41	6,61	6,68	6,89	6,76	6,78
17	6,46	6,59	6,78	6,59	6,7	6,44
E62	6,31	6,43	6,58	7,16	7,06	7,03
E14	6	6,24	6,35	6,72	6,59	6,51
E41	NB	6,66	6,78	7,01	6,85	6,84

			Redox (mV)			
	0	162	245	336	427	525
B3	NB	55	56	89	98	27
B4	NB	-23	-27	115	97	101
E25	-204	-18	-37	66	-68	87
E61	-200	162	145	128	102	98
E6	-90	-12	-35	57	26	63
17	-82	11	47	103	85	85
E62	-43	-6	-27	32	69	46
E14	-163	45	56	89	85	103
E41	NB	-16	-29	102	-56	99

			Zuurstof (mg/l)			
	0	162	245	336	427	525
B3	NB	3,9	2,89	1,84	3,67	2,01
B4	NB	0,79	0,85	2,48	1,95	2,32
E25	1,25	5,85	4,89	3,11	4,67	2,39
E61	0,79	2,69	2,35	3,21	4,02	2,59
E6	0,78	1,39	1,25	1,68	2,09	2,65
17	0,77	1,03	1,21	2,06	3,25	2,15
E62	0,6	1,33	1,26	1,86	1,89	2,43
E14	1,5	1,19	1,17	2,06	2,17	2,14
E41	NB	0,64	0,68	1,56	2,01	1,89

	grondwaterstand (m-mv)					
	0	162	245	336	427	525
B3	NB	0,53	0,42	0,4	0,48	0,15
B4	NB	0,81	0,77	0,49	0,67	0,16
E25	0,7	0,69	0,64	0,42	0,48	0,15
E61	0,5	0,3	0,27	0,25	0,47	0,1
E6	0,65	0,74	0,65	0,37	0,58	0,09
17	0,37	0,35	0,32	0,28	0,46	0,12
E62	0,56	0,53	0,52	0,39	0,55	0,12
E14	0,78	0,82	0,75	0,58	0,68	0,17
E41	NB	0,75	0,64	0,45	0,47	0,12

	conductiviteit (µS/cm)					
	0	162	245	336	427	525
B3	NB	191	425	563	568	421
B4	NB	1030	956	527	726	416
E25	585	90	295	394	396	498
E61	308	187	315	425	468	468
E6	284	442	401	458	445	569
17	481	598	486	542	596	426
E62	435	499	569	428	654	492
E14	439	415	456	467	396	325
E41	NB	404	359	463	498	458

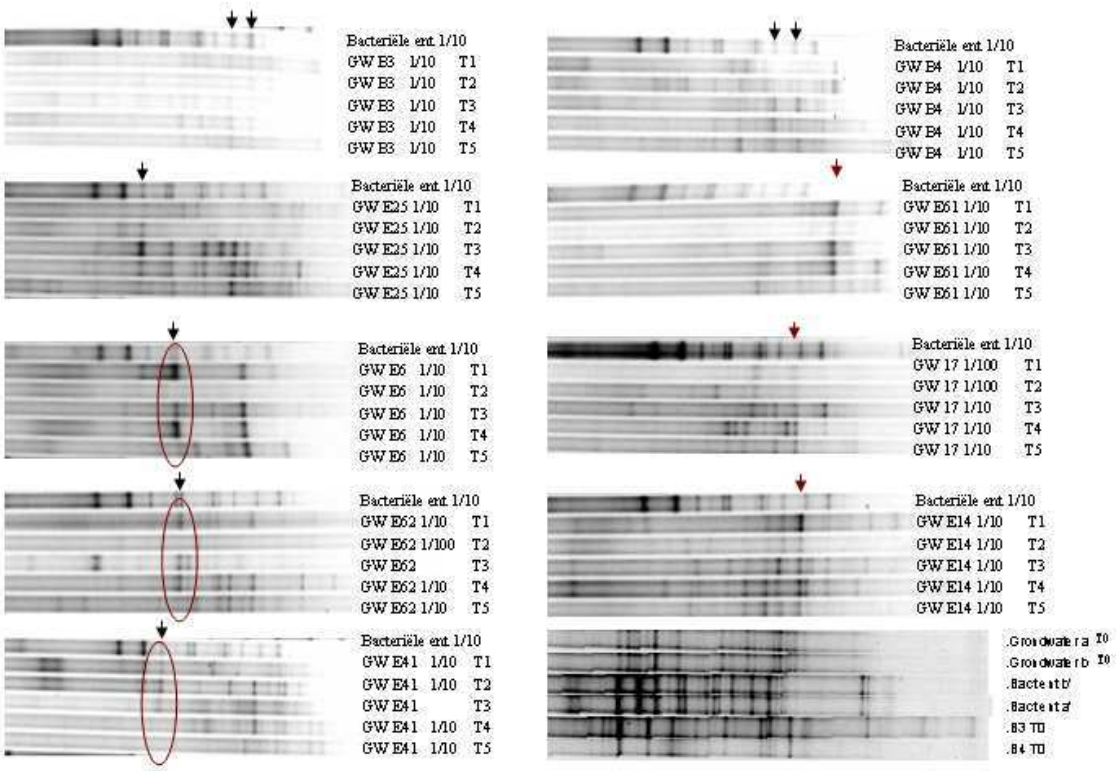
	Temperatuur (°C)					
	0	162	245	336	427	525
B3	NB	9,9	9,8	10,7	10,1	9,6
B4	NB	10,6	10,2	10,7	10,1	9,6
E25	16,8	10,4	9,9	10,7	10,1	9,5
E61	18,5	10	9,7	10,6	9,9	9,7
E6	14,4	10,4	10,1	10,5	10,3	9,6
17	14,2	10,7	10,2	10,5	10,1	9,8
E62	13,2	11,7	10,5	10,6	10,2	9,6
E14	17,5	11,6	10,5	10,6	10,2	9,5
E41	NB	10,2	9,8	10,6	9,9	9,7

Analyseresultaten grondwater. De analysegegevens (minerale olie) van de door Vito opgevolgde monitoringspeilbuizen zijn weergegeven in tabel 54. De waargenomen gehalten zijn gering. In de twee meest verontreinigde peilbuizen (E25 en E61) lijkt een dalende trend te kunnen worden waargenomen, hoewel het gehalte in E25 na 500 dagen monitoring terug was gestegen.

Tabel 54. Minerale olie concentraties van grondwaterstalen uit verschillende peilbuizen

	C10-40 (µg/l)					
Minerale Olie						
Tijd (dagen)	0	162	245	336	434	525
B3	**2000**	250	<100	<100	420	<100
B4	**3000**	**520**	<100	<100	170	<100
E25	NB	**3700**	**1300**	230	380	**1200**
E61	NB	**630**	**1000**	**620**	160	<100
E6	NB	<50	<100	<100	NB	<100
17	NB	<50	<100	<100	<100	<100
E62	NB	<50	<100	<100	370	<100
E14	NB	<50	<100	<100	240	<100
E41	NB	290	<100	290	140	<100
Lozing	NB	NB	<100	NB	NB	<100

Uit analyse van de eubacteriële populatie aanwezig in grondwaterstalen genomen in functie van de tijd (Figuur 25) blijkt duidelijk dat in sommige peilbuizen een verschuiving van de populatie optreedt in functie van de tijd waarbij een bandenpatroon zichtbaar wordt waarvan enkele banden overeenkomen met deze in het bandenpatroon van de door de aannemer gebruikte bacteriële ent (aangeduid door zwarte pijlen). Dit is het geval voor de grondwaterstalen uit de meeste peilbuizen, behalve voor enkele zoals E61, E41 en 17 (aangeduid met rode pijlen) zijn er niet duidelijk een of een aantal overeenkomstige banden. Mogelijk hechten de bacteriën uit de microbiële ent zich echter op aquifer/bodem materiaal aangezien hun koolstofbron, namelijk olie, ook voornamelijk op bodemdeeltjes aanwezig is. Analyses van de microbiële populatie tonen inderdaad aan dat bepaalde bacteriën afkomstig uit grondwater stalen die een band geven op dezelfde hoogte als deze aanwezig in de bacteriële ent niet in staat zijn te overleven in het grondwater (T5 tov T1, T2 en T3, aangeduid met cirkel).



Figuur 25. Analyse van de eubacteriële microbiële populatie in de grondwater stalen uit bemonsterde peilbuizen in functie van tijd gedurende bioremediatie. GW, grondwater stalen; 1/10 en 1/100 verwijst naar de overeenkomstige verdunning van de DNA stalen alvorens PCR-DGGE uit te voeren; Grondwater stalen werden genomen, gefiltreerd en de filter werd geanalyseerd op de aanwezige eubacteriële microbiële populatie op T0 (0 dagen), T1 (na 162 dagen), T2 (na 245 dagen), T3 (na 336 dagen), T4 (na 434 dagen), en op T5 (na 525 dagen).

Microbiële tellingen van zowel totale heterotrofe CFU als olie-afbrekende CFU afkomstig van de grondwaterstalen tonen dat er een zeer kleine populatie van heterotrofen ($<10^6$) aanwezig is die in staat is om te groeien op rijk milieu alsook een zeer kleine populatie ($<5.10^5$) van olie-afbrekers die in staat is om olie af te breken (tabel 53). De meeste olie-afbrekers werden geteld in grondwaterstalen uit peilbuis E61 en E25, beiden gelegen in de kern van de verontreinigingen. Beide peilbuizen resulteerden in de hoogste olie-concentraties na analyse van grondwaterstalen zoals weergegeven in tabel 54.

Tabel 55. Heterotrofe en olie-afbrekende CFU in grondwater stalen uit bemonsterde peilbuizen in functie van de tijd.

Heterotrofe populatie (CFU/ml)								
Tijd (dagen)	E25	E61	E6	17	E62	E14	E41	lozing
0	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
162	5,5E+04	2,2E+05	5,5E+04	NB	1,7E+03	NB	NB	NB
245	1,3E+04	9,1E+02	1,2E+03	<20	<20	1,4E+03	3,1E+04	3,1E+03
336	2,4E+05	2,6E+04	9,3E+02	1,8E+03	1,4E+02	1,8E+03	3,3E+03	NB
434	2,0E+05	3,4E+05	3,9E+02	6,5E+02	3,4E+04	6,4E+03	1,3E+04	NB
525	3,5E+05	6,0E+04	6,0E+01	1,2E+03	1,2E+04	5,6E+02	2,2E+04	NB

Olie-degraderende populatie (CFU/ml)								
Tijd (dagen)	E25	E61	E6	17	E62	E14	E41	lozing
0	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
162	6,7E+02	1,2E+03	6,0E+01	NB	1,0E+02	NB	NB	NB
245	1,2E+03	5,7E+04	6,0E+02	<20	<20	4,0E+02	5,5E+03	<20
336	9,2E+04	3,3E+03	1,2E+02	3,0E+02	<20	2,1E+03	6,3E+02	NB
434	3,7E+04	4,4E+05	1,6E+02	6,0E+02	<20	2,2E+03	3,4E+03	NB
525	1,0E+05	<20	8,0E+01	<20	5,4E+03	<20	1,5E+03	NB

8.6.4 Monitoringsresultaten begeleidende EBSD

De betrokken EBSD volgt de sanering op door regelmatige staalname van de bodem in de kernen van de verontreiniging. Tevens worden de hoeveelheden onttrokken grondwater, bodemlucht, e.d. gerapporteerd. Bij het opstellen van voorliggend rapport waren 4 voortgangsverslagen (1 t/m 4) beschikbaar bij Vito.

Op dat moment was in totaal 162 m³ grondwater onttrokken (gemiddeld 2 m³/d) waarvan 144 m³ na zuivering terug werd geïnfiltreerd (met nutriënten en bacteriën). 51756 m³ bodemlucht werd onttrokken. De hoeveelheid geïnjecteerde lucht bedroeg volgens het laatste voortgangsrapport ca. 4 m³/u per kern (discontinu).

De resultaten van de opvolging van de oliegehalten in grond en grondwater door de EBSD zijn weergegeven in tabellen 56 en 57.

Tabel 56. Opvolging minerale olie in grond door EDSB (0,5-1,5 m-mv.; mengstalen van 2 à 4 boringen) (mg/kg ds)

	Jul 2003	**Okt 2003**	**Dec 2003**	**Maa 2004**	**Jun 2004**
Laadkaai	17000	22000	5500	19000	4700
		13000	12000	6400	15000
Tankenpark	4800	14000	6000	5800	5200

Tabel 57. Opvolging minerale olie in grondwater door EBSD (µg/L)

pb	Jul 2003	Okt 2003	Dec 2003	Maa 2004	Jun 2004
Laadkaai					
20	140	510	260	230	250
E25	330	920	440	460	800
Pb101			22000	9800	1500
Pb102			2800	4600	51000
tanks					
18	1600	6400	4700	200000	
E29	930	12000	570	44000	3800
E46	1600	6900	1300	3100	8600
E61	500	420	260	210	560

Bespreking. Zowel de analyseresultaten van de EBSD van de bodem als deze van het grondwater zouden voorlopig doen besluiten dat er geen gunstige evolutie optreedt van de oliegehalten in de bodem.

De analyseresultaten van Vito tonen echter aan dat er wel degelijk sprake is van een toename van de biologische olie-afbrekende activiteit in de bodem. De metingen hiervoor gebeurden echter in de geplaatste mesocosms in peilbuizen. Deze mesocosms bevonden zich klaarblijkelijk wel in de invloedszone van het saneringssysteem.

In het BSP was een totale saneringsduur vooropgesteld van 15 maanden (zonder verdere onderbouwing). Op basis van de resultaten kan worden gesteld dat de benodigde saneringsduur sterk werd onderschat.

Dit schijnbaar negatieve saneringsresultaat is waarschijnlijk een gevolg van de aanwezigheid van een grote vuilvracht onder de vorm van NAPL (residuele oliefase in de bodemporiën. Deze olie kan slechts worden afgebroken door micro-organismen indien (1) de olie eerst oplost in de waterfase; (2) er voldoende zuurstof wordt aangevoerd voor de afbraak. Bioremediatie van de pollutie zal dus slechts optreden indien de oliehoudende bodem voldoende homogeen wordt doorspoeld (met lucht en water/micro-organismen/nutriënten). Staalnames in de kern die nog weinig olieafbraak aantonen zijn mogelijk een gevolg van discontinue verdeling van olie in de bodem, waarbij een onbekende fractie van de totale olievracht (nog) niet beschikbaar is voor microbiële afbraak en/of niet wordt bereikt door de geïnjecteerde lucht en het water.

De monitoring zelf van de sanering via peilbuizen geplaatst in de oliesmeerzones blijkt ook problematisch: er kan zich na verloop van tijd pure olie in verzamelen, zeker indien discontinue drukverschillen optreden door perslucht- en waterinjectie.

8.7 Toetsing van de bioremediatievariant aan de criteria voor acceptatie

In deze paragraaf wordt de in deze appendix besproken site getoetst aan de acceptatiecriteria voor bioremediatievarianten zoals geformuleerd in hoofdstuk 4 van voorliggende CGP.

De in-situ saneringsvariant die werd ontworpen voor deze voorbeeldlocatie, is een combinatie van bioventing, biosparging, bioaugmentatie en bodemspoelen.

Tabel 58 geeft eerst de algemene overwegingen weer die de haalbaarheid van in-situ bioremediatie kunnen helpen evalueren.

Tabel 58: Samenvattende tabel criteria voor acceptatie bioremediatievariant

Factoren	Haalbaarheid bioremediatievariant	
	Goed	**Mogelijk problematisch**
A. Technische		
NAPL-zone/drijflaag	verwijderd	**aanwezig/omvangrijk**
Afbreekbaarheid van de verontreiniging onder site-specifieke omstandigheden	goed	**slecht of onzeker**
Dochterproducten	**worden ook afgebroken/ leveren geen risico**	accumuleren/ vormen een risico
Co-contaminanten	**geen**	aanwezig (afbraakremmende stoffen)
Bodemheterogeniteit/ voorkeursbanen	homogeneen	**heterogeen/sterk gelaagd/niet-doorspoelde zones**
Receptor aanwezigheid		
- Actueel:	**afwezig**	aanwezig; hoog risico
- Potentiëel:	**afwezig**	aanwezig; hoog risico
Nabijheid grondwater-Beschermingszone of –Wingebied	**Nee**	ja
Zekerheid m.b.t. vuilvracht, verdeling over bodemfasen en 3-dim. omvang verontreiniging	Hoog	**laag (vb. onzekerheid aanwezigheid puur product)**
B. Bevoegde instantie: Acceptatiemogelijkheden	**geen beleidsconflict; geen technische onzekerheden**	beleidsconflict; technische onzekerheden
C. Praktische en Economische haalbaarheid:		
Monitoringspunten buiten terreingrens	**onbeperkte bereikbaarheid**	beperkte of geen bereikbaarheid
Financiële aspecten	lange-termijn, juridisch bindende budgetten beschikbaar	**geen lange-termijn budgetten voorzien** (bij falende sanering)

Uit de check-list blijkt dat 4 criteria wijzen op mogelijke problemen voor in-situ bioremediatie.

De nadelige factoren hebben betrekking op de aard van de verontreiniging (oude, zwaardere olietypes: doorgaans minder vlot bioafbreekbaar). De biologische afbreekbaarheid was niet op voorhand getest op labo- of pilootschaal. Haalbare terugsaneerwaarden werden derhalve niet onderbouwd. Verdere nadelige factoren waren het feit dat de olie voorkomt onder de vorm van NAPL en dat de bodem heterogeen is van opbouw. 'Technische onzekerheden' zijn er in principe niet, gezien het geïnstalleerde saneringssysteem is gebaseerd op technieken waarmee reeds voldoende praktijkervaring bestaat. In het BSP waren geen budgetten voorzien voor een reservevariant (bij falende in-situ bioremediatie).

Een verdere toetsing aan de checklist voor bioventing/biosparging is weergegeven in tabel 59. Ook hieruit blijkt, gezien het aantal keer 'nee', dat de toepasbaarheid van bioventing/sparging niet zonder verder onderzoek kan worden aangenomen.

Tabel 59. Checklist van gegevens die beschikbaar moeten zijn om de toepasbaarheid van bioventing/biosparging te kunnen vaststellen

Parameters	
1. Factoren die bijdragen tot permeabiliteit van de bodem:	
1.1 Er zijn er geen klei- of andere storende lagen aanwezig	ja
1.2 Het grondwater zit dieper dan 1 m-mv.	nee
1.3 De hydraulische conductiviteit > 10^{-7} m/s (leem).	Ja/nee
1.4 De bodem is vrij van structuren die mogelijk de luchtcirculatie bemoeilijken.	onbekend
1.5 Bodem pH tussen 6 en 8.	ja
1.6 Bodemtemperatuur tussen de 10℃ en de 45℃.	ja
2. Eigenschappen van de polluenten:	
2.1 De polluenten zijn aëroob biologisch afbreekbaar.	Ja/gedeeltelijk
2.2 De concentratie aan minerale olie < 25000 ppm.	Ja
2.2.1 Indien polluenten aanwezig zijn met:	-
2.2.1.1 Dampspanning > 0,5 mmHg?	Ja/nee
2.2.1.2 Henry constante > 100 atm/molfractie?	-
2.2.1.2 Kookpunt < 250-300℃?	Ja/nee
2.2.2 Werd het blootstellingsrisico uitgaande van vervluchtiging in rekening gebracht?	nee
2.2.3 Werd een fase met bodemluchtextractie overwogen voor de bioventing fase?	nee
2.2.4 Werd een fase met persluchtinjectie overwogen voor de biosparging fase?	nee