



## **Eigenschappen en werking**

---

**Samengesteld door:**



**Dan Bryant, Kristof Van Vooren en Stijn Haghebaert**

**Roodborstjeslaan 31  
8300 Knokke Heist**

**Augustus, 2005**

## INHOUDSTAFEL

|           |  |          |
|-----------|--|----------|
| <b>1.</b> | <b>REDUCTIEVE DECHLORINATIE EN CAP18™ VERSTERKING.....</b> | <b>1</b> |
| 1.1       | PRINCIPES VAN REDUCTIEVE DECHLORINATIE .....               | 1        |
| 1.2       | ACHTERGRONDVRAAG NAAR WATERSTOF .....                      | 2        |
| 1.2.1     | <i>Opgeloste Zuurstof</i> .....                            | 3        |
| 1.2.2     | <i>Nitraat</i> .....                                       | 3        |
| 1.2.3     | <i>Ijzer</i> .....   | 4        |
| 1.2.4     | <i>Sulfaat</i> .....                                       | 4        |
| 1.2.5     | <i>Methanogenese</i> .....                                 | 5        |
| 1.2.6     | <i>Oleaatprecipitatie</i> .....                            | 5        |
| 1.3       | CAP18™ SUBSTRAAT .....                                     | 6        |
| 1.3.1     | <i>Samenstelling en Microbieel Gebruik</i> .....           | 6        |
| 1.3.2     | <i>Inhibitie van Methanogenese</i> .....                   | 7        |
| 1.4       | BRUIKBARE VERBINDINGEN .....                               | 7        |

### Bijlagen:

#### Bijlage 1 : **Reductieve dechlorinatie**

**Figuur 1-1 : *PCE reductieve dechlorinatie***

**Figuur 1-2 : *Triacylglycerolstructuur***

**Figuur 1-3 : *Structuur van representatief C18 onverzadigd vetzuur***

**Figuur 1-4 : *De bètaoxidatiecyclys voor vetzuren***

**Figuur 1-5 : *Vetzuurafbraaksequentie tijdens bètaoxidatie***

## 1. REDUCTIEVE DECHLORINATIE EN CAP18™ VERSTERKING

Het basisprincipe achter gemanipuleerde (of gestimuleerde) bioremediatie bestaat erin geschikte geochemische voorwaarden tot stand te brengen en een goede voedingsbron (substraat) te verschaffen om de groei van natuurlijke microbiële populaties te stimuleren. Op hun beurt genereren deze microben waterstof die door een tweede groep microben wordt gebruikt om de gechloreerde koolwaterstoffen te metaboliseren. In een aantal uitvoerige publicatiebronnen worden grondwatermicrobiologie en de basis van gemanipuleerde bioremediatie van gechloreerde oplosmiddelen besproken (bijv. Wiedemeier et al., 1999; United States Environmental Protection Agency [U.S. E.P.A.], 1999, 2000; Chapelle, 2001). In dit deel wordt een samenvatting gegeven van de microbiële reductieve dechlorinatie van gechloreerde oplosmiddelen, de achtergrondvraag naar waterstof en de manier waarop CAP 18™ reductieve dechlorinatie stimuleert.

### 1.1 Principes van Reductieve Dechlorinatie

Reductieve dechlorinatie is een reactie waarbij een gechloreerd oplosmiddel als een elektronen-acceptor fungeert en een chlooratoom op de molecule wordt vervangen door een waterstofatoom, wat resulteert in de reductie van het gechloreerde oplosmiddel (Wiedemeier et al., 1999). Wanneer deze reactie biologisch gemedieerd is, wordt de reactie als halorespiratie aangeduid en worden de organismen als halorespiratoren aangeduid. De bekende weg voor de dechlorinatie van perchlooretheen (Per), is voorgesteld in Figuur 1-1 en is gebaseerd op de volgende veralgemeende oxidatiereductiereactie:



waarbij H<sub>2</sub> moleculaire waterstof is, C koolstof is, Cl chloride is en H waterstof is. In deze reactie is H<sub>2</sub> de elektronendonor en is het gechloreerde oplosmiddel de elektronenacceptor. De zuivere stoichiometrie van reductieve dechlorinatie is 1 mol H<sub>2</sub> voor elke mol verwijderd chloride.

Per legt een microbiële reductieweg af waarbij één chlooratoom sequentieel wordt vervangen door waterstof, wat resulteert in de vorming van trichlooretheen (Tri), dichlooretheen (in

hoofdzaak het cis-1,2-dichlooretheenisomeer [cis-DCE-isomeer]) en vinylchloride (VC) als tussenproducten (Figuur 1-1). De eerste en tweede afbraakstappen, van Per tot Tri en van Tri tot cis-DCE, verlopen betrekkelijk snel en treden onder bijna volledig anaërobe voorwaarden op. Daaropvolgende afbraakstappen van cis-DCE tot VC en van VC tot etheen, verlopen betrekkelijk trager onder anaërobe voorwaarden en beide verbindingen kunnen ook onder aërobe voorwaarden worden afgebroken.

Men is van mening dat halorespiratie het merendeel uitmaakt van de afbraak van gechloreerd oplosmiddel waarbij natuurlijke attenuatie optreedt (Wiedemeier et al., 1999). Opdat halorespiratie van gechloreerde oplosmiddelen optreedt, moet aan twee samenhangende voorwaarden zijn voldaan: (1) het oxidatiereductiepotentieel moet laag zijn (reductieve dechlorinatie wordt pas energetisch gestimuleerd nadat zuurstof, nitraat en ijzer uit de aquifer zijn uitgeput), en (2) er moet een voldoende toevoer van fermenteerbare substraten zijn (bijv. vetzuren uit CAP18™) voor de productie van opgeloste waterstof (waterstof is de belangrijkste elektronendonator voor halorespiratie). Reductieve dechlorinatie is het gunstigst bij waterstofconcentraties hoger dan 1 nanomolair (nM). De belangrijkste vooronderstelling voor biostimulatie is dus de additie van voldoende fermenteerbaar substraat, zodat aan de achtergrondvraag naar waterstof wordt voldaan en sterk reducerende voorwaarden vereist door de microben verantwoordelijk voor dehalorespiratie worden ingesteld, en de handhaving van die voorwaarden om de afbraak van de gechloreerde doelkoolwaterstoffen te bewerkstelligen.

## 1.2 Achtergrondvraag naar waterstof

Wiedemeier et al. (1999) veronderstellen dat de volgende reeks gebeurtenissen waarschijnlijk optreedt op de meeste sites die halorespiratie ondergaan:

- (1) Aërobe bacteriën verbruiken niet-gechloreerde substraten tot de zuurstof is uitgeput.
- (2) Nitraatreducerende bacteriën verbruiken niet-gechloreerde substraten tot het nitraat is uitgeput.
- (3) Ijzerreducerende bacteriën verbruiken niet-gechloreerde substraten tot het ferri-ijzer ( $\text{Fe}^{+3}$ ) is uitgeput.

- (4) Bij fermentatiereacties worden niet-gechloreerde substraten verbruikt en wordt waterstof gegenereerd die wordt gemetaboliseerd door halorespiratoren om oplosmiddelen te dechloreren; concurrerende reacties omvatten sulfaatreducerende bacteriën die niet-gechloreerde substraten verbruiken en sulfaat wordt uitgeput, en methanogenen die waterstof verbruiken om methaan te genereren.

Er zijn dus tal van waterstofvereisten (chemische en biochemische) in aquifers, naast de vraag van halorespiratoren om de oplosmiddelen te dechloreren. De hoofdvereisten zijn opgeloste zuurstof, nitraat, ferri-ijzer, sulfaat en, onder bepaalde omstandigheden, kooldioxide. Naast de aquifervereisten kunnen de vetzuren gehydrolyseerd uit CAP18™ worden geprecipiteerd als oleaten door reactie met calcium en magnesium. Elk van deze vereisten moet worden behandeld bij de evaluatie van de vereiste hoeveelheid CAP18™, en elk van de samengaannde analyten kan worden gemeten voor de evaluatie van de algemene redoxtoestand van de aquifer. Deze achtergrondvereisten worden hieronder beschreven.

### 1.2.1 Opgeloste Zuurstof

Opgeloste Zuurstof (OZ) verdient de meeste voorkeur als elektronenacceptor gebruikt voor de microbiële afbraak van organische koolstof. Halorespiratoren zijn anaërobe bacteriën die over het algemeen niet kunnen functioneren bij OZ-concentraties hoger dan ongeveer 0,5 mg/L. Aërobe respiratie (die over het algemeen niet doeltreffend is voor gechloreerde oplosmiddelen) overheerst bij hogere OZ-concentraties. De reactie van OZ met waterstof is:

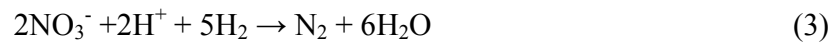


waarbij O<sub>2</sub> moleculaire zuurstof is en H<sub>2</sub>O water is. Er wordt dus 2 mol H<sub>2</sub> voor de reductie van 1 mol O<sub>2</sub> verbruikt.

### 1.2.2 Nitraat

Nadat OZ is uitgeput, gebruiken de microben nitraat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) als een elektronenacceptor voor anaërobe biologische afbraak. Nitraatreductie is energetisch gunstiger dan reductieve

dechlorinatie. Opdat reductieve dechlorinatie optreedt, moeten de  $\text{NO}_3^-$ -concentraties kenmerkend minder dan bij benadering 1 mg/L bedragen. De reactie van  $\text{NO}_3^-$  met waterstof is:



waarbij  $\text{N}_2$  moleculaire stikstof is. Er wordt dus 5 mol  $\text{H}_2$  voor de reductie van 2 mol  $\text{NO}_3^-$  verbruikt.

### 1.2.3 Ijzer

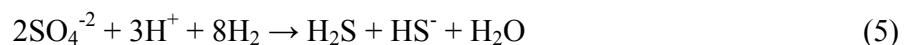
Nadat  $\text{NO}_3^-$  is verbruikt, is de volgende voorkeur verdienende reactie de reductie van  $\text{Fe}^{+3}$  tot ferri-ijzer ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Hoewel ijzerreductie onder dezelfde thermodynamische voorwaarden als reductieve dechlorinatie optreedt, zijn ijzerreducerende bacteriën betrekkelijk doeltreffender dan halo-respiratoren. Ijzerreductiemiddelen verbruiken dus snel beschikbare waterstof en onderdrukken reductieve dechlorinatie, waarbij beschikbare waterstof wordt verbruikt, ongeacht de productiesnelheid van waterstof. De stoichiometrische reactie voor ijzerreductie is:



er wordt dus 1 mol  $\text{H}_2$  voor elke 2 mol gereduceerd  $\text{Fe}^{+3}$  verbruikt.

### 1.2.4 Sulfaat

Sulfaat ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) is de volgende voorkeur verdienende elektronenacceptor. Sulfaatreductie is thermodynamisch minder gunstig dan reductieve dechlorinatie.  $\text{SO}_4^{-2}$ -reductie is echter een sterk concurrerende put voor waterstof, omwille van de hoge concentratie ten opzichte van de concentratie gechloreerd oplosmiddel die kenmerkend op verontreinigde sites voorkomt. De  $\text{SO}_4^{-2}$ -reductiereactie met waterstof is:



waarbij H<sub>2</sub>S waterstofsulfide is en HS<sup>-</sup> waterstofsulfidion is. Er wordt dus 4 mol H<sub>2</sub> voor elke 1 mol gereduceerd SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> verbruikt.

### 1.2.5 Methanogenese

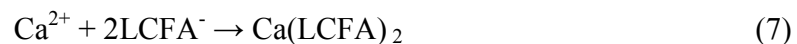
Kooldioxide (CO<sub>2</sub>) is de laatste elektronenacceptor, gebruikt door bacteriën om methaan (CH<sub>4</sub>) te produceren (een werkwijze aangeduid als methanogenese). Hoewel halorespiratie thermodynamisch minder gunstig is dan methanogenese, kan reductieve dechlorinatie onder methanogene voorwaarden optreden. De stoichiometrische reactie voor methanogenese is:



Er wordt dus 4 mol H<sub>2</sub> voor elke 1 mol gereduceerd CO<sub>2</sub> verbruikt.

### 1.2.6 Oleaatprecipitatie

Calcium en magnesium kunnen reageren met lange-keten vetzuren zoals die gehydrolyseerd uit CAP18™ om oleaat te precipiteren, dat een betrekkelijk onoplosbaar substraat is. Deze werkwijze is dezelfde als de vorming van zeepschuim uit hard water; hard water heeft hoge calcium- en magnesiumconcentraties die reageren met lange-keten vetzuren uit de zeep om zeepschuim te vormen. Oleaat kan langzaam oplossen om de vetzuren vrij te geven en biologische afbraak te stimuleren (Yang & McCarty, 2002), hoewel deze werkwijze niet in aquifers werd aangetoond. De stoichiometrische reactie voor oleaatprecipitatie is:



waarbij Ca<sup>2+</sup> calciumion is, LCFA<sup>-</sup> een lange-keten vetzuur is, en Ca(LCFA)<sub>2</sub> calciumoleaat is. 1 mol Ca kan dus 2 mol LCFA precipiteren. Magnesium kan zich op dezelfde wijze als calcium gedragen. Deze extra precipitatievereiste moet bij de CAP18™ reagensvereisten worden opgenomen.

### 1.3 CAP18™ Substraat

CAP18™ is een formulering van levensmiddelkwaliteit, lange-keten vetzuren, geraffineerd uit natuurlijke plantaardige oliën en gebruikt voor milieusaneringsoplossingen. Het gebruik van plantaardige oliën om anaërobe afbraak te stimuleren, werd voor het eerst voorgesteld door Hunter & Follett (1994) om nitraat in grondwater te behandelen. Meer recentelijk blijkt uit stationaire tests (Lee et al., 2000; Zenker et al., 2000) en veldpiloottests (Boulicault et al., 2000; Lee et al., 2001; Wiedemeier, 2002) dat plantaardige oliën zeer doeltreffend zijn bij het stimuleren van reductieve dechlorinatie van gechloreerde oplosmiddelen, en het U.S. Air Force Center for Environmental Excellence heeft een officieel protocol ontwikkeld voor toepassingen van plantaardige oliën (Wiedemeier et al., 2001). In dit deel wordt de manier beschreven waarop plantaardige oliën, en de vetzuren die plantaardige oliën bevatten, de natuurlijke afbraak van gechloreerde oplosmiddelen in grondwater stimuleren.

#### 1.3.1 Samenstelling en Microbieel Gebruik

CAP18™ is, net als de plantaardige oliën waaruit het is afgeleid, een mengsel van verbindingen bekend als triacylglycerolen. Triacylglycerolen zijn verbindingen bestaande uit drie vetzuurmoleculen gebonden door een glycerolhoofdketen (Figuur 1-2). Na injectie in een aquifer hydrolyseren de triacylglycerolen langzaam om de vetzuren vrij te geven, zoals oliezuur (Figuur 1-3). De hydrolysereacties verlopen betrekkelijk traag, wat resulteert in de aanhoudende productie van vetzuren over een zeer lange periode (jaren). Eens vrijgegeven, digeren microben de lange-keten vetzuren, putten energie en produceren elektronen voor reductieve dechlorinatie volgens een werkwijze bekend als bètaoxidatie. Bètaoxidatie is een vierstaps, enzymgedieerde sequentie van oxidatie-, hydrolyse- en thiolysereacties die bij alle microben en dieren inclusief de mens optreedt (Figuur 1-4; Novak & Carlson, 1970; Stryer, 1988; Lalman & Bagley, 2000, 2001). Tijdens de bètaoxidatie wordt de vetzuurmolecule gespleten om azijnzuur en waterstof te produceren, en wordt het verwante vetzuur door een dubbele-koolstofsequentie ingekort. De ingekorte vetzuurmolecule blijft deze cyclus herhalen, waarbij een reeks kortere-keten vetzuren en uiteindelijk hetzij azijnzuur hetzij propionzuur wordt geproduceerd. Elke cyclus produceert twee tot vier waterstofatomen die dan beschikbaar zijn voor de reductie van organische chemische stoffen van belang (CSB's). Zo produceert de bètaoxidatie van linolzuur, een C18 vetzuur en

component van CAP18™ 9 azijnzuurmoleculen en 15 H<sub>2</sub>-moleculen (Figuur 1-5). De waterstofopbrengst bedraagt bij benadering 1 kg H<sub>2</sub> per 9,7 kg CAP18™.

### 1.3.2 Inhibitie van Methanogenese

Een van de hoofdbeperkingen bij substraatadditie voor de stimulering van reductieve dechlorinatie is dat de aquifer zo anaëroob wordt dat microben bekend als methanogenen doeltreffender voor waterstof concurreren dan de dehalorespiratoren. Onder methanogene voorwaarden gebruiken microben een groot deel van de geproduceerde waterstof om methaan (CH<sub>4</sub>) te genereren in plaats van de doel-CSB's te vernietigen, waarbij dus de vernietingsdoeltreffendheid van CSB beduidend wordt gereduceerd. Onverzadigde C18 vetzuren die in hoofdzaak CAP18™ omvatten, zijn bekend als inhibitoren van acetoclaste methanogenen, wat in hoofdzaak in een lagere methaanproductie resulteert (Galbraith et al., 1971; Hanaki et al., 1981; Koster & Cramer, 1987; Rinzema et al., 1994; Lalman & Bagley, 2000, 2001). Het resultaat van geïnhibeerde methanogenese is een veel doeltreffender gebruik van de waterstof voor de vernietiging van de doel-CSB's. De inhibitie van methanogenese schaadt de dehalorespiratoren of andere microben die doel-CSB's reduceren niet en is een uniek kenmerk van onverzadigde C18 vetzuren vastgesteld bij CAP18™.

## 1.4 Bruikbare verbindingen

Gechloreerde oplosmiddelen zoals tetrachlooretheen (Per), trichlooretheen (Tri), trichloorethaan (TCA), en de natuurlijke splitsingsproducten ervan zoals dichlooretheen(DCE); nitraat; perchloraat; explosieven; hexavalent chroom.

## Bijlage 1:

---

### Reductieve dechlorinatie

**Figuur 1-1 :** *PCE reductieve dechlorinatie*

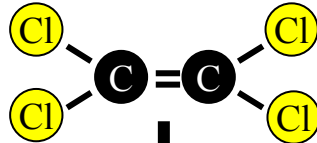
**Figuur 1-2 :** *Triacylglycerolstructuur*

**Figuur 1-3 :** *Structuur van representatief C18 onverzadigd vetzuur*

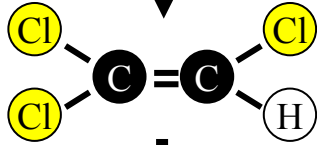
**Figuur 1-4 :** *De bètaoxidatiecyclus voor vetzuren*

**Figuur 1-5 :** *Vetzuurafbraaksequentie tijdens bètaoxidatie*

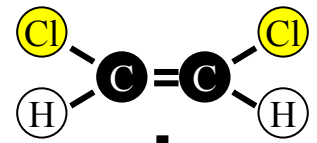
**Perchlooretheen**



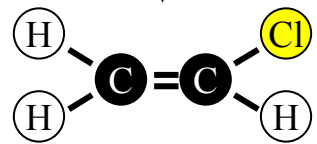
**Trichlooretheen**



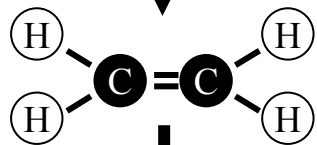
**cis-1,2-Dichlooretheen**



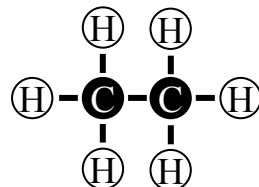
**Vinylchloride**



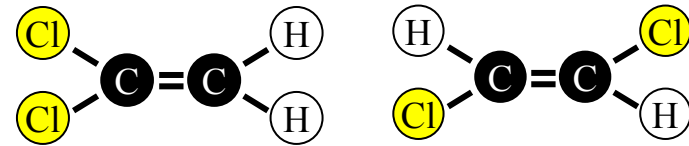
**Etheen**



**Ethaan**



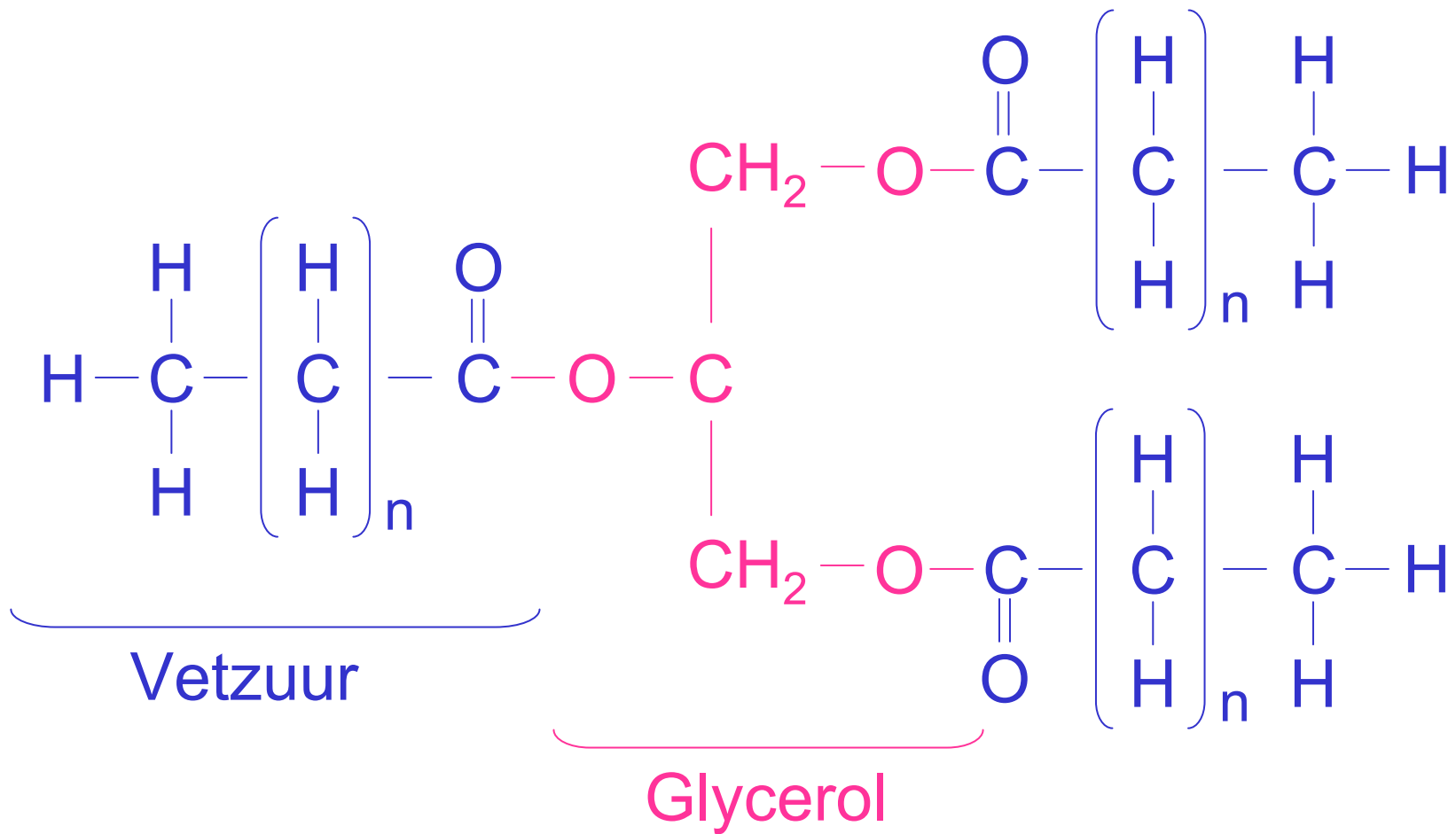
Beperkte biologische reactie



1,1-Dichlooretheen

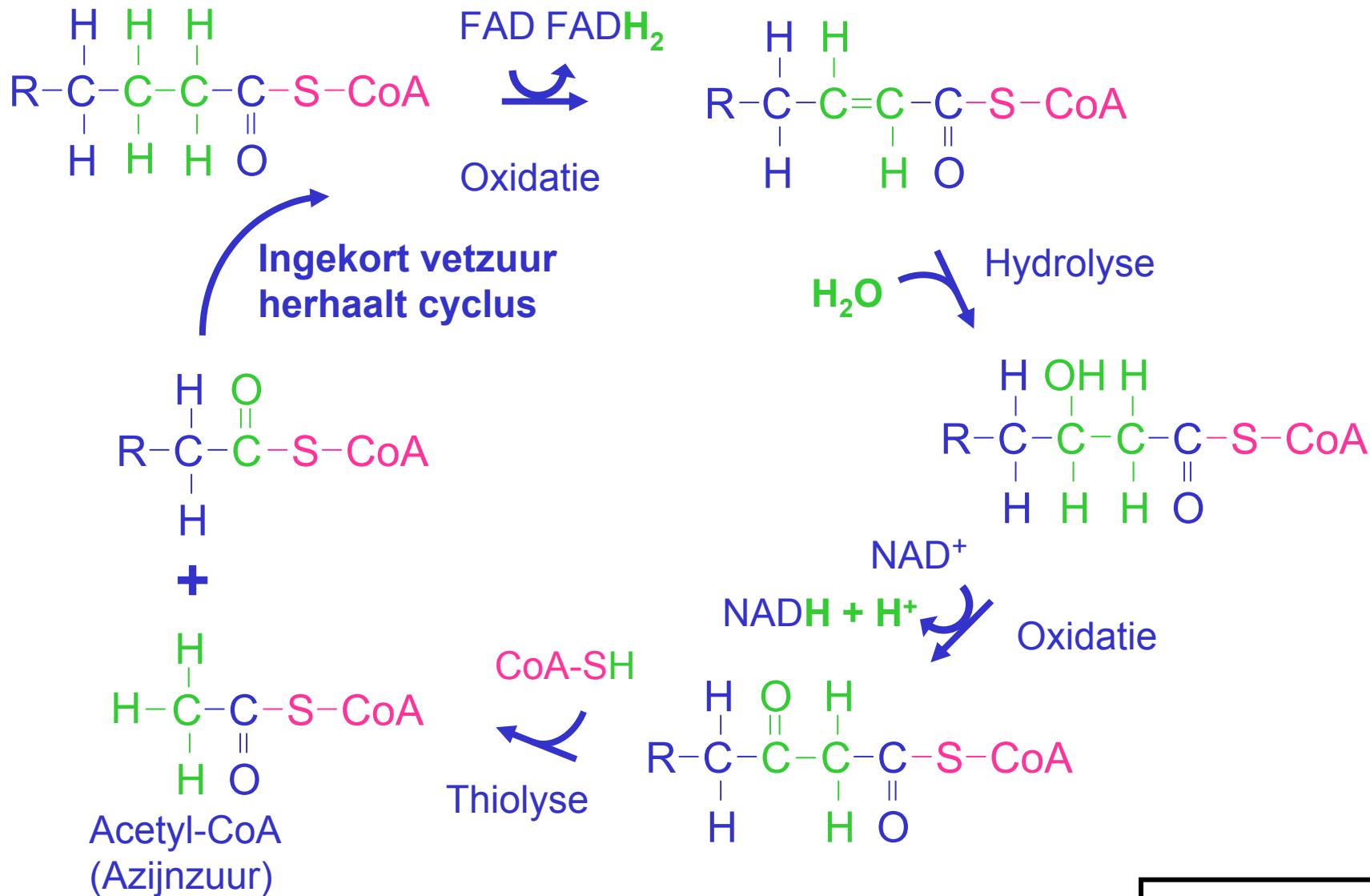
trans-1,2-Dichlooretheen

FIGUUR 1-1  
PCE REDUCTIEVE  
DECHLORINATIEWEG

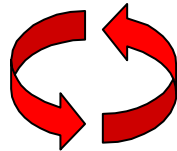
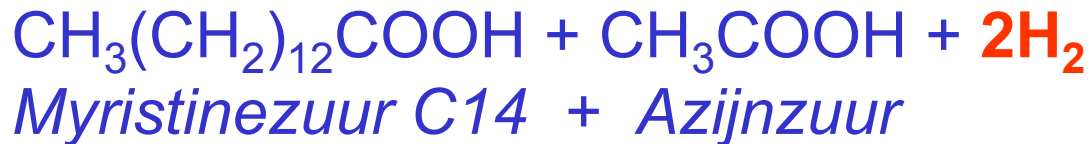
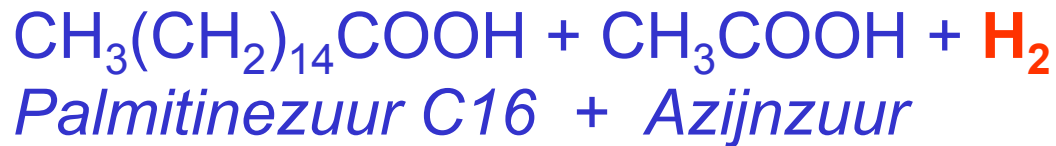
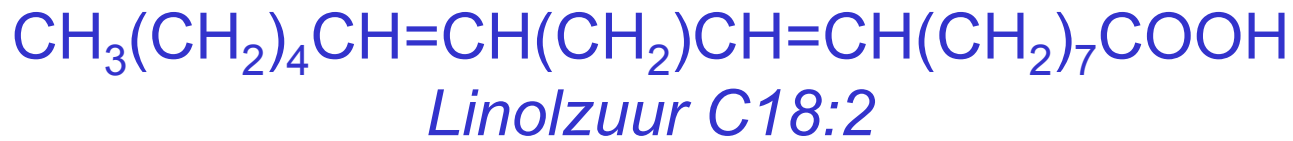


FIGUUR 1-2  
TRIACYLGLYCEROL-  
STRUCTUUR





FIGUUR 1-4  
DE BETA(β)OXI-  
DATIECYCLUS VOOR  
VETZUREN



6 extra cycli



Uiteindelijke Productie: 9 azijnzuurmoleculen

15  $\text{H}_2$ -moleculen

FIGUUR 1-5  
VETZUURAFBRAAK-  
SEQUENTIE TIJDENS  
BETA( $\beta$ )OXIDATIE