

Aantonen en stimuleren biologische afbraak van MtBE

MtBE, wat moeten we ermee?!

Methyl tertiair-butylether (MtBE) wordt in Europese benzine bijgemengd om de verbrandingswaarde te verhogen en de uitstoot van luchtverontreinigende stoffen te verlagen. Inmiddels is duidelijk dat deze organische verbinding ook niet risicoloos is. Deltares heeft samen met industriële partners een strategie ontwikkeld voor het aantonen van de biologische afbraak en het beheersen van MtBE-gerelateerde grondwater- en bodemvervuiling.

Door: Alette Langenhoff, Harry Veld, Bas van der Zaan en Jan Gerritse

Over de auteurs:

Mevr. dr. ir. A.A.M. Langenhoff is onderzoeker/projectleider bij Deltares op het gebied van microbiële processen, o.a. bodemsanering, natuurlijke afbraak en gestimuleerde afbraak

Dr. H. Veld is onderzoeker/projectleider bij Deltares op het gebied van organische chemie

Dr. B.M. van der Zaan is onderzoeker/adviseur bij Deltares op het gebied van microbiële processen en moleculaire detectie

Dr. J. Gerritse is specialist microbiologie bij Deltares, en werkt aan water- en bodemzuivering en detectie van microbiële processen.

drinkwaterbereiding, afgeleid. Uit dit onderzoek blijkt dat MtBE pas bij hoge concentraties een risico kan opleveren voor de volksgezondheid (9400 µg/l; interventiewaarde).¹ De ecologische risicogrens voor MtBE in grondwater is nog hoger (47.500 µg/l; interventiewaarde).¹ Bij een landelijke inventarisatie van grondwater bij benzinstations zijn MtBE concentraties aangetroffen die variëren van 1 tot 260 µg/l, met enkele uitschieters

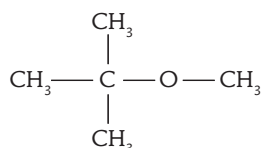
Methyl tertiair-butylether (MtBE; figuur 1) wordt als antiklop middel toegevoegd aan benzine sinds loodhoudende benzine eind jaren tachtig vanwege de toxiciteit van lood werd verboden. De toevoeging van MtBE resulteert in een betere verbranding, een beter functionerende motor en een lagere uitstoot van koolmonoxide.

MtBE is een kleurloze, vluchtige, licht ontvlambare vloeistof met een ether-achtige geur. De geur- en smaakdrempels zijn respectievelijk 15 µg/l en 40 µg/l.¹ MtBE is mengbaar met de meeste organische oplosmiddelen, goed oplosbaar in water (42 g/l en 35 g/l bij respectievelijk 20°C en 10°C) en relatief eenvoudig en goedkoop te produceren. Een minder prettige eigenschap is dat MtBE schadelijk kan zijn voor de volksgezondheid.

MtBE is in grondwatersystemen mobiel en stroomt met vrijwel dezelfde snelheid als grondwater door de ondergrond. Als MtBE in de bodem terecht komt, wordt het snel via het grondwater verspreid, sneller dan de meeste andere benzinegerelateerde stoffen. Hierdoor is MtBE sinds eind jaren tachtig een veel voorkomende verontreiniging in het grondwater en de bodem.

REGELGEVING

Het RIVM heeft risicogrenzen voor MtBE in bodem, sediment, grondwater, oppervlaktewater, drinkwater, en ten behoeve van de



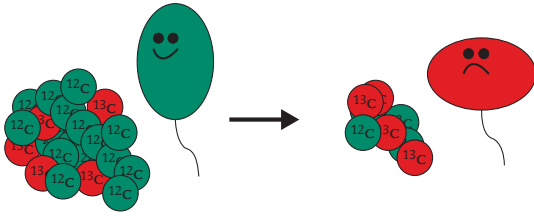
FIGUUR 1. CHEMISCHE STRUCTUUR VAN METHYL TERTIAR-BUTYL ETHER (MTBE).

MtBE is pas in hoge concentraties toxisch, maar geeft al bij lage concentraties een ongewenste geur en smaak aan water

boven de 9.400 µg/l.² Concentraties hoger dan 9.400 µg/l worden voornamelijk aangetroffen op productie- of opslaglocaties van MtBE. Dit betekent dat MtBE meestal geen direct gevaar voor de gezondheid en het milieu oplevert, maar de aanwezigheid ervan in het grondwater is ongewenst, onder andere vanwege het gebruik van dit water als drinkwater en de bijkomende geur en smaakafwijking. Indien MtBE aanwezig is in het inname water van een drinkwaterwinning resulteert dit in additionele kosten voor de waterbehandeling.

In Nederland is sinds 2009 voor MtBE verontreinigingen een herstelrichtwaarde van 1 µg/l vastgesteld, als inspanningsverplichting.³ Deze waarde sluit aan bij de 1 µg/l die als signaalwaarde wordt gehanteerd in het Waterleidingbesluit. In hoeverre het acceptabel is om van de richtwaarde af te wijken, wordt bepaald via een aantal in de circulaire⁴ beschreven factoren en omstandigheden, waaronder afwegingen in het kader van de best beschikbare saneringstechnieken. De inspanningen moeten hierbij gericht zijn op het realiseren van de door het RIVM geadviseerde risicowaarde voor geur voor drinkwaterbereiding (15 µg/l).

Indien een locatie een geschiedenis heeft met MtBE, dan moet naar een mogelijke MtBE verontreiniging gemeten worden. Het



FIGUUR 2. PRINCIPE VAN FRACTIONERING; VERANDERING VAN DE KOOLSTOF-ISOTOPEN RATIO ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) VAN DE UITGANGSSTOF BIJ AFBRAAK.

gaat hierbij vooral om tankstations, raffinaderijen en opslagdepots. Een praktische invulling van de circulaire is gegeven in de “Handreiking; invulling geven aan zorgplicht Wbb bij MtBE en EtBE-verontreinigingen”.⁴

NATUURLIJKE EN GESTIMULEERDE AFBRAAK VAN MTBE

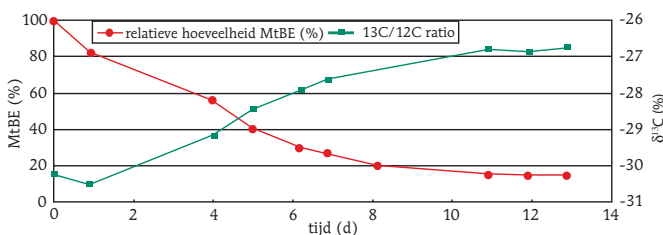
Gezien de verspreiding van MtBE en tertiair butylalcohol (TBA, een afbraakproduct van MtBE) in het grondwater is er vraag ontstaan naar methoden om eventuele natuurlijke afbraak (NA) te kunnen aantonen, conform de gangbare wetgeving rond mobiele bodemverontreinigingen. Kennis over de condities waaronder de afbraak van MtBE kan optreden, is nodig om inzicht te krijgen in het gedrag van MtBE in grondwater. Deze kennis over de afbraak van MtBE kan verder gebruikt worden om verontreinigde locaties aan te pakken. Hiertoe is in een consortium een project opgestart om de afbraak van MtBE onder verschillende milieuomstandigheden te meten.

Hiervoor is allereerst de afbraak van MtBE in het laboratorium onderzocht onder verschillende redox condities.

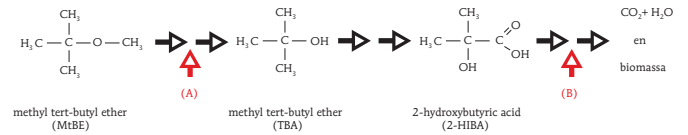
Batchexperimenten zijn uitgevoerd in 250 ml flesjes met materiaal (grond en grondwater) van 5 verschillende verontreinigde industriële locaties met een geringe (100 $\mu\text{g}/\text{l}$) tot hoge (300.000 $\mu\text{g}/\text{l}$) MtBE verontreiniging. Aan de batches is MtBE (15 mg/l) toegevoegd en verschillende elektronen acceptoren, respectievelijk, zuurstof, chloraat (ClO_3^-), nitraat of sulfaat. Hierbij bleek dat de biologische afbraak van MtBE in aanwezigheid van zuurstof, nitraat of chloraat optreedt. In aanwezigheid van sulfaat of onder methanogene condities (geen elektronenacceptor toegevoegd) was afname van MtBE niet aantoonbaar. Hieruit is geconcludeerd dat MtBE afbraak in ieder geval mogelijk is door het doseren van zuurstof, nitraat of chloraat. Chloraat is een minder bekende elektronenacceptor die eerder succesvol is gebruikt in een veldexperiment voor biologische afbraak van een benzeenverontreiniging.^{5,6}

AANTONEN AFBRAAK MTBE MET INNOVATIEVE METHODEN

Als MtBE in het grondwater terecht komt, kan het zich convectief met het grondwater door de bodem verspreiden. Concentraties in het grondwater kunnen hierbij nogal fluctueren, waardoor het moeilijk is om met concentratiemetingen te bepalen of er afbraak is opgetreden. Daarom is door Deltares een combinatie van andere technieken ontwikkeld en gebruikt om de aannemelijkheid van de omzetting van MtBE in het grondwater aan te tonen.



FIGUUR 3. MTBE AFBRAAK EN ISOTOPEN FRACTIONERING IN EEN BATCHEXPERIMENT.



FIGUUR 4. OMZETTING VAN MTBE, MET DE SLEUTELENZYMEN (A) MTBE MONOOXYGENASE (MMO) EN (B) ISOBUTYRYL-COA MUTASE (ICMA).

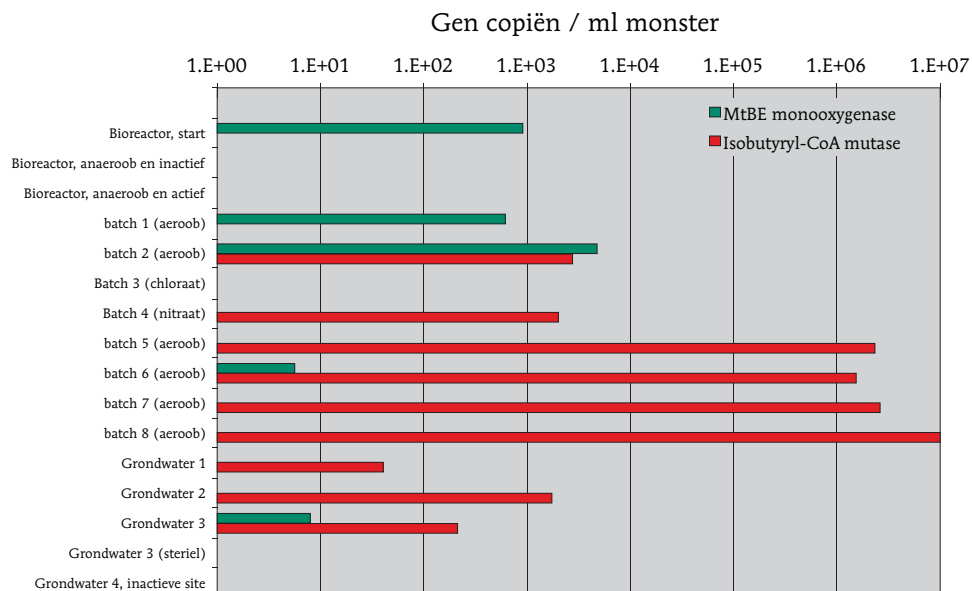
De eerste techniek maakt gebruik van het principe dat bacteriën bij het afbreken van MtBE een ‘voorkeur’ hebben voor verbindingen met een ‘lichte’ koolstofisotoop (^{12}C). Hierdoor verandert de verhouding tussen ^{12}C - en ^{13}C -isotopen in het MtBE in het grondwater als gevolg van afbraak (figuur 2). Dit verschijnsel wordt isotopen fractionering genoemd en de bijbehorende analyses zijn stabiele isotopenanalyses. De fractionering is onafhankelijk van de MtBE concentratie. Naast isotopenanalyses op het koolstof atoom kunnen bij MtBE ook isotopenanalyses op het waterstof atoom (^1H en ^2H) worden uitgevoerd. Hiermee kunnen verschillende biologische afbraakmechanismen (anaerobe en aerobe) worden onderscheiden.

Afbraak van MtBE is aantoonbaar met stabiele isotopen analyses en DNA analyses

Een isotopenfractionering van het koolstof atoom van meer dan 0,5‰ ten opzichte van de oorspronkelijke MtBE verontreiniging duidt op afbraak. Er bestaat een duidelijke relatie tussen de hoeveelheid omgezet MtBE en de fractionering zoals is aangetoond in batchexperimenten (figuur 3). Een daling van de MtBE concentratie verloopt synchroon met een toename van de ^{13}C : ^{12}C isotopen ratio van MtBE.

De tweede techniek is gebaseerd op het aantonen van DNA dat codeert voor enzymen die een rol spelen bij de afbraak van MtBE. Voor de omzetting van MtBE zijn er twee belangrijke enzymen geïdentificeerd, MtBE monooxygenase (MMO) en isobutyryl-CoA mutase (ICMA), zie figuur 4. Deze enzymen zijn specifiek voor de afbraak van MtBE en niet betrokken bij andere omzettingen. Als er MMO aanwezig is, betekent dit dat er afbraakpotentie is voor MtBE. Als ICMA wordt aangetroffen, is aangetoond dat er afbraakpotentie is voor 2-HIBA, één van de intermediären bij de afbraak van MtBE. De aanwezigheid van ICMA toont dus aan dat het afbraakproduct TBA verder kan worden afgebroken, wat belangrijk is omdat TBA net als MtBE een ongewenste verbinding in het grondwater is. Als een van deze enzymen aangetroffen wordt, is dit een bewijs dat omzetting van MtBE op kan treden. De aanwezigheid van DNA dat codeert voor deze enzymen is in een aantal MtBE afbrekende batches en grondwatermonsters gemeten (figuur 5). In de actieve aerobe batches worden MMO en ICMA aangetroffen, maar ze zijn niet altijd allebei aanwezig. Dit kan, omdat we nog geen volledig beeld hebben van alle mogelijke afbraakroutes van MtBE en er vermoedelijk ook andere, nog onbekende, enzymen bij betrokken kunnen zijn. Daarom wordt altijd op de aanwezigheid van beide enzymen geanalyseerd.

Ook wordt in sommige MtBE afbrekende cultures geen MMO of ICMA aangetroffen. Het gaat hierbij om monsters uit anaerobe cultures die MtBE afbreken in aanwezigheid van chloraat. Dit be-



FIGUUR 5. DETECTIE VAN MTBE MONOOXYGENASE (MMO) EN ISOBUTYRYL-COA MUTASE (ICMA) IN OPHOPINGSCULTURES EN GRONDWATERMONSTERS.

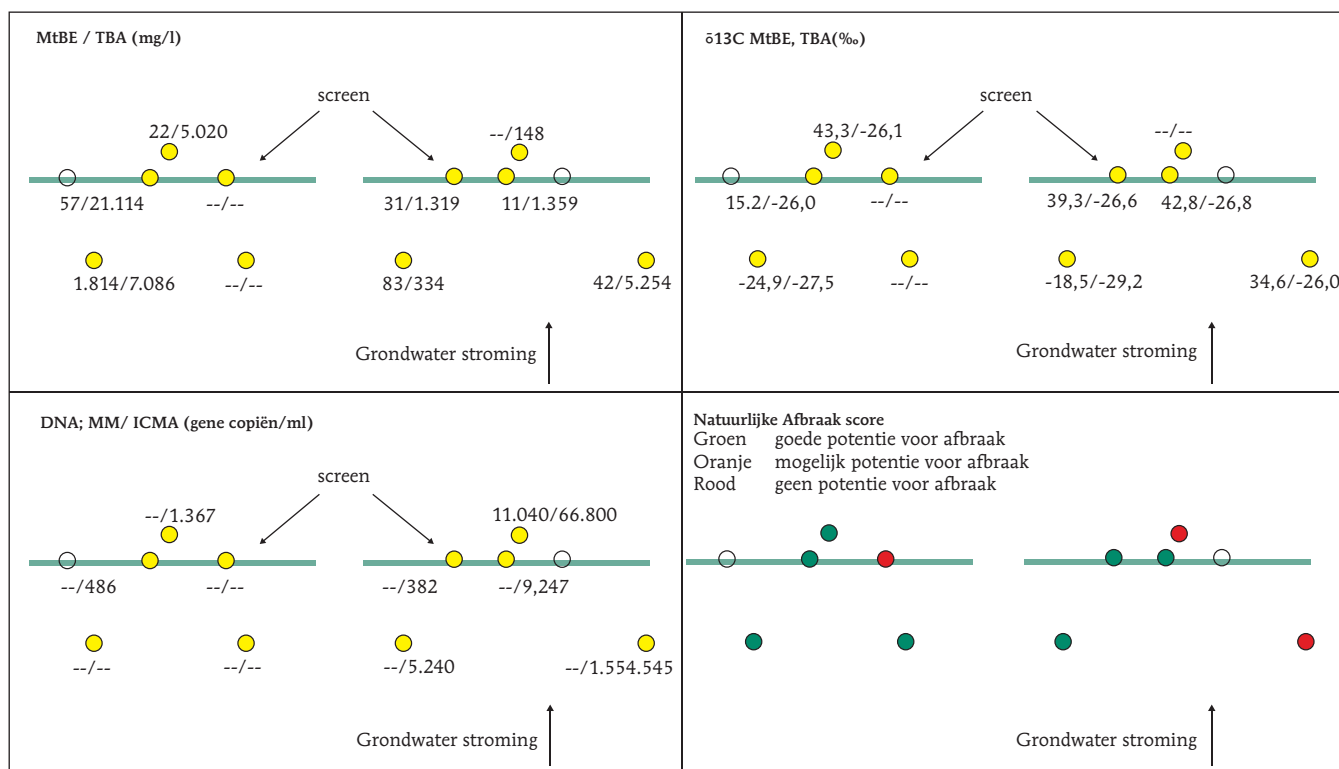
tekent dat bij dit afbraakmechanisme andere, nog onbekende enzymen betrokken zijn. In de steriele en niet-actieve batches is geen DNA voor de enzymen aangetroffen. Dit bevestigt dat de ontwikkelde analyses specifiek zijn voor de omzetting van MtBE; wanneer geen MtBE wordt omgezet, dan worden deze enzymen niet aangetroffen.

Uit dit onderzoek blijkt het mogelijk om de afbraak van MtBE op meerdere wijzen aan te tonen. Naast concentratiemetingen van MtBE is aangetoond dat stabiele isotopen analyses van MtBE en analyses van het DNA dat codeert voor de bij de afbraak betrokken enzymen hiervoor te gebruiken zijn. Met andere woorden, verschillende aanwijzingen vormen samen de drie bewijslijnen (eng: three lines of evidence) voor Natuurlijke Afbraak, die ge-

bruikt kunnen worden voor het aannemelijk maken van de afbraak van MtBE in het veld.

VAN MONITORING NAAR SANERING

De ontwikkelde analyses zijn vervolgens succesvol gebruikt voor het vaststellen van MtBE afbraak op een aantal verontreinigde locaties. Met deze resultaten en gegevens van gangbare grondwateranalyses (temperatuur, redoxpotentiaal, geleidbaarheid, zuurstof, TOC, DOC, ammonium, fosfaat, nitraat, nitriet, ijzer, sulfaat, methaan, chloride, MtBE en afbraakproducten, BTEX, vluchtige en niet-vluchtige minerale olie) zijn op basis van een multivariate analyse, parameters gevonden, die aangeven of (natuurlijke) afbraak van MtBE op een locatie aannemelijk is. Uit deze statistische analyse bleek dat isotopenfractionering van



FIGUUR 6. CONCENTRATIEMETINGEN, STABIELE ISOTOPEN ANALYSES, MOLECULAIRE ANALYSES EN NATUURLIJKE AFBRAAK SCORE IN EEN AANTAL PEILBUISZIJN OP EEN MTBE VERONTREINIGDE LOCATIE.

MtBE, de aanwezigheid van MMO of ICMA DNA en de aanwezigheid van zuurstof goede indicatoren zijn voor afbraak van MtBE. Met deze kennis is vervolgens een beslissingsondersteunend model ontwikkeld, vergelijkbaar met het model voor natuurlijke afbraak van gechloreerde koolwaterstoffen.⁷ Het model geeft via het berekenen van een "Natuurlijke Afbraak score" aan of afbraak van MtBE op een locatie op kan treden, en in welke mate de omstandigheden hiervoor gunstig zijn.

Het beslissingsondersteunende model is op enkele locaties toegepast en geeft een goed overzicht van de heersende grondwateromstandigheden en MtBE afbraak. Een voorbeeld is te zien in figuur 6, waar de concentratiemetingen, stabiele isotopen analyses, moleculaire analyses en Natuurlijke Afbraak score in een aantal peilbuizen op een MtBE verontreinigde locatie zijn weergegeven. Op deze locatie is een aeroob bioscherm aanwezig en de resultaten laten zien dat de MtBE concentraties stroomafwaarts van het

Met meervoudige bewijsvoering is het mogelijk MtBE afbraak in het veld aan te tonen; het beslissingsondersteunend model is een praktisch hulpmiddel hierbij

scherm lager zijn dan stroomopwaarts. Fractionering van MtBE wordt aangetoond en DNA dat codeert voor de betrokken enzymen is met name stroomafwaarts van het scherm aanwezig. De berekening van de Natuurlijke Afbraak score geeft vervolgens een samenvatting van de monitoringresultaten en geeft een beeld bij welke peilbuizen de afbraak goed verloopt. Hieruit blijkt dat ook vóór het scherm al enige afbraak van MtBE optreedt.

Door gebruik van het beslissingsondersteunende model bleek het voor verschillende locaties mogelijk om aannemelijk te maken dat natuurlijke afbraak optreedt, of dat extra maatregelen nodig zijn om de MtBE afbraak te stimuleren. Daarnaast is de effectiviteit van een gestimuleerde MtBE afbraak in kaart gebracht. Voor een brede toepassing van het beslissingsondersteunende model moet deze echter nog verder gevalideerd worden.

CONCLUSIE

Met de ontwikkelde, gevalideerde en toegepaste analyses zijn de mogelijkheden om afbraak van MtBE aan te tonen uitgebreid. Gezien de huidige discussie over MtBE verontreinigde locaties is het van belang om afbraak van MtBE te kunnen aantonen met een meervoudige bewijsvoering. Met de gebruikte multivariate analyses is de voorspellende waarde van deze analyses bepaald en de toepasbaarheid is op een aantal locaties succesvol aangetoond.

NOTEN

1. Swartjes, F.A., A.J. Baars, R.H.L.J. Fleuren, P.F. Otte. 2004. Risicogrenzen voor MTBE (Methyl tertiair-Butyl Ether) in bodem, sediment, grondwater, oppervlaktewater, drinkwater en voor drinkwaterbereiding. RIVM rapport 711701039. 78 p.
2. Wipfler, L., K. Grobber. 2007. Landelijk inventariserend onderzoek MTBE-verontreiniging in Nederland; onderzoek en interpretatie MTBE-data tankstations en depots. Tauw rapport Kenmerk R002-4353225CMG-sbb-V06-NL. 54 p.
3. Staatscourant. Toepassing Zorgplicht bij MTBE- en ETBE-verontreinigingen. 2008. nr. 246
4. Werkgroep Handreiking. 2010. Handreiking Invulling geven aan zorgplicht bij MTBE- en ETBE-verontreinigingen.
5. Langenhoff, A.A.M. 2010. Afbraak van benzeen stimuleren met nitraat of chlooraat. Land en Water 50(3):42-43.
6. Langenhoff, A.A.M. H. Richnow, J. Gerritse. 2009. Degradation of benzene at a site amended chlorate. Bioremediation Journal 13(4):1-7.
7. Sinke, A.J.C., T.J. Heimovaara, H. Tonnaer, J. ter Meer. 2001. Beslissingsondersteunend model natuurlijke afbraak. CUR/NOBIS rapport nr. 98-1-21. 56 p.

Met dank aan Andre Cinjee, Fredericke Hannes, Paul ter Huurne, Habiba Mizab, en Kathrin Reimer voor hun technische ondersteuning in dit project.