

Project 7151316

Biodegradatie van micro-verontreinigingen met behulp van schimmeltechnologie

Projectleider: W.A. Traag

Rapport 98.017

juli 1998

SPOOR II: PCB's, HCH, DDT EN DIOXINEN

Fase 1b. Laboratoriumonderzoek

afdeling: Natuurlijke Inhoudsstoffen, Residuen en Contaminanten

W.A. Traag, T. Zuidema

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Medewerkers:

H.J.M. Op den Camp, A. Pol

Vakgroep Microbiologie & Evolutiebiologie, Katholieke Universiteit Nijmegen

L.J.L.D. Van Griensven, J.P.G. Gerrits

Proefstation voor de Champignoncultuur

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 0317-475400

Telefax 0317-417717

Copyright 1998, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (2x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN

H.J.M. Op den Camp, A. Pol

Vakgroep Microbiologie & Evolutiebiologie, Katholieke Universiteit Nijmegen

L.J.L.D. Van Griensven, J.P.G. Gerrits

Proefstation voor de Champignoncultuur

WOORD VOORAF

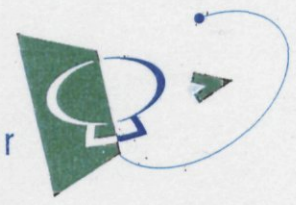
rikilt-dlo



- AKZO NOBEL
- AKZO NOBEL
- BION Overijssel
- DHV Milieu
- Proefstation voor de champignoncultuur
- RIZA
- DLO-Staringcentrum

DHV is penvoerder van het consortium dat wordt gevormd door:

- Gemeente Nieuw- en Oude Dijk
- Gemeente Nieuw- en Oude Dijk
- RIKILT-DLO
- Rijkswaterstaat (RIZA) Noord-Holland



Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat

Het consortiumonderzoek is gericht op de ontwikkeling van een groep Microbiologie & Evolutie, die de kennis van de champignoncultuur en het Rijkswaterstaat onderzoek maakt deel uit van de Spoor 1 Olie en PAK. In zaderstaand schema is de plaats van het onderzoek in het totale project gegeven.

Biodegradatie van microverontreinigingen met actieve slibtechnologie

Spoor 1 Olie en PAK

Fase 1: Pilotonderzoek en toetsing



sc-dlo



1. Toetsing van andere biologische technieken
2. Toetsing van andere biologische technieken

Fase 2: Praktijkproef
Tunnelmarzen



Gemeenschappelijk Orgaan Baggerspecie Zuid Holland

WOORD VOORAF

Het NOBIS-project "Biodegradatie van microverontreinigingen met behulp van schimmeltechnologie" wordt uitgevoerd door een consortium waarin deelnemen:

- AKZO NOBEL Chemicals, locatie Hengelo
- AKZO NOBEL Organon Teknika
- BION Overijssel BV
- DHV Milieu en Infrastructuur BV
- Proefstation voor de Champignoncultuur/Katholieke Universiteit Nijmegen
- RIZA
- DLO-Staringcentrum.

DHV is penvoerder van het consortium dat wordt gesponsord door:

- Gemeente Hengelo
- Gemeenschappelijk Orgaan Baggerspecie Zuid-Holland
- RIKILT-DLO
- Rijkswaterstaat directie Noord-Holland.

Het voorliggende laboratoriumonderzoek is uitgevoerd door de Vakgroep Microbiologie & Evolutiebiologie (K.U. Nijmegen), het Proefstation voor de Champignoncultuur en het Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwproducten (RIKILT-DLO). Het onderzoek maakt deel uit van Spoor II, fase 1b. In onderstaand schema is de plaats van het deelonderzoek in het totale project gegeven:

Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie

Spoor I Olie en PAK

Fase 1. Pilotonderzoek en toetsing

1 Pilotonderzoek:

- a - Tunnelproeven
- Halproeven
- Landfarmproeven

1 Toetsing aan andere biologische technie- b ken

Fase 2. Praktijkproeven:

- Tunnelproeven
- Halproeven
- Landfarmproeven

Spoor II PCB's, HCH, DDT en dioxines

Fase 1. Oriëntatie en selectie schimmels

1 Literatuuronderzoek

a Bepaling van analysemethoden

1 Laboratoriumonderzoek:

- b - Biologisch
- Chemisch analytisch

Fase 2. Pilotonderzoek:

- Tunnelproeven
- Halproeven
- Landfarmproeven

Fase 3. Praktijkproeven

Fase 3. Evaluatie

- 3a Opschalings- en uitvoeringsaspecten
 - 3b Eindrapportage
-

COLOFON

Project : Biodegradatie van microverontreinigingen met behulp van
schimmeltechnologie

Status : Definitief

Versie : 1

Projectnummer NOBIS : 960108

Registratienummer : ML-TE19970373

DHV-Dossier : K0676-71-007

Omvang rapport : 16 pagina's, ... tabellen

Auteurs : H.J.M. Op den Camp, A. Pol, W.A. Traag, T. Zuidema,
L.J.L.D. Van Griensven, J.P.G. Gerrits,

Projectleider : ing. L.A. van der Kooij

Datum : 17 mei 1998

SAMENVATTING

Het huidige project is uitgevoerd om de toepassingsmogelijkheden van residuen uit de commerciële paddenstoelenkweek voor bioremediatie te onderzoeken. Nadat de optimale condities waren vastgesteld (temperatuur, vocht etc.) is in een experiment gedurende twee maanden een vergelijking gemaakt van champost en pleurotus residue. Voor controle-experimenten werden gestoomde entmaterialen gebruikt. Als te behandelen grond is gekozen voor een mengsel van drie met respectievelijk HCH, DDT, PCB en dioxinen verontreinigde gronden. Er is gewerkt met “natuurlijk” aanwezige verontreinigingen ('incured residue'), er zijn geen verontreinigingen toegevoegd.

Uit de productie van CO₂ door de grondkolommen en de droge stof/as analyses is duidelijk dat er sprake is geweest van een hoge biologische activiteit (afbraak organische stof 31-37%). Niet tegenstaande deze biologische activiteit kon er echter geen afbraak van de “incured residues” geconstateerd worden.

INHOUD	blz
SAMENVATTING	4
1. INLEIDING	7
2. UITVOERING	8
2.1 Bereiding van mengsels (uitgevoerd door het Proefstation)	8
2.2 Bepaling metabole activiteit	8
2.3 Meting van enzymactiviteiten	8
2.4 Opstelling voor de incubatie gedurende 2 maanden	9
2.5 Bepaling van het gehalte aan gechloreerde verbindingen	9
3. RESULTATEN	10
3.1 Droge stof analyses	10
3.2 Bepaling van de metabole activiteit	11
3.3 Invloed van vochtgehalte op de metabole activiteit	12
3.4 Meting van enzymactiviteiten	13
3.5 Incubatie van de mengsels gedurende 2 maanden	13
3.5.1. CO ₂ productie van de kolommen	14
3.5.2. Laccase activiteit in de kolommen	14
3.5.3. Organische stof analyse van de inhoud van de kolommen	15
3.6 Gehalte aan organische microverontreinigingen	15
4. CONCLUSIES	16
5. AANBEVELINGEN	16

1 INLEIDING

Bodemverontreinigingen, veroorzaakt door menselijk handelen, bestaan vaak uit verbindingen als polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's), polychloorbifenylen (PCB's), hexachloorcyclohexaan (HCH), DDT (1,1-bis(4-chlorofenyl)-2,2,2-trichloorethaan), penta-chloorfenol (PCP) en dioxinen. Bacteriële afbraak van deze verbindingen is zeer moeilijk of zelfs onmogelijk. Zo zijn PAK's met vier of meer ringen, evenals PCB's met vier of meer chlooratomen per bifenyl, resistent tegen bacteriële degradatie. In een project in het kader van het Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-Situ Sanering (NOBIS) wordt onderzocht in hoeverre het mogelijk is om bepaalde schimmelsoorten te gebruiken voor bodemsanering. Het eerste spoor van onderzoek betreft de afbraak van PAK's en minerale oliën. Het tweede spoor, waarvan het in dit rapport beschreven onderzoek deel uitmaakt, is gericht op het bestuderen van de schimmeltechnologie voor afbraak van HCH's, PCB's, DDT en dioxinen. Gestart is met een literatuuronderzoek wat tot doel had het verzamelen van achtergrondkennis over de mechanismen waarmee (wit-rot) schimmels (gehalogeneerde poly-) cyclische koolwaterstoffen afbreken. Een tweede activiteit, uitgevoerd door het RIKILT-DLO, was gericht op het optimaliseren van de juiste extractie en bepalingmethoden aan de hand van drie grondsoorten die verontreinigd zijn met respectievelijk HCH's, DDT, PCB's en dioxinen. Op basis van de verkregen resultaten [RIKILT rapport 98.01] is een representatief mengmonster samengesteld wat vervolgens gebruikt is in het hier beschreven laboratoriumonderzoek. Het uitgevoerde laboratoriumonderzoek is onder te verdelen in:

A. METINGEN VAN ENZYMACTIVITEITEN

Wit-rot schimmels zijn in staat lignine af te breken met behulp van extracellulaire enzymen. Afbraak van de lignine vindt plaats via een niet-specifiek radicaalmechanisme. Als gevolg hiervan kunnen ook veel verontreinigende verbindingen, vanwege de structurele overeenkomst met onderdelen van lignine, in principe afgebroken worden door het ligninolytisch enzymstelsel. De belangrijkste componenten van deze enzymstelsels zijn:

Lignine peroxidase (ligninase, LiP): LiP kan vanwege zijn hoge redoxpotentiaal zowel fenolische als niet-fenolische lignine-componenten oxideren. Het enzym wordt beschouwd als de sleutelcomponent van het ligninolytisch systeem vanwege zijn rol bij de oxidatie van niet-fenolische aromatische eenheden.

Mn-peroxidase (MnP): Het mangaan-afhankelijke peroxidase (MnP) katalyseert de oxidatie van Mn^{2+} door H_2O_2 , waarbij het gevormde Mn^{3+} vervolgens verscheidene fenolische lignine verbindingen oxideert via fenoxyradicalen. Non-fenolische componenten worden, vanwege de lagere redoxpotentiaal van MnP ten opzichte van LiP, niet afgebroken door MnP.

Laccase: Laccase is een 'blue copper' oxidase dat de 1-elektron oxidatie van fenolen en fenolische lignine structuren (via fenoxyradicalen) katalyseert, waarbij uiteindelijk 4 elektronen worden overgedragen op O_2 en water wordt gevormd. De 1-elektron oxidatie heeft o.a. C-oxidatie en aryl-alkyl-splitsing tot gevolg. Daarnaast is ook een ringsplitsend effect van het enzym aangetoond.

B. BEPALING RESPIRATIESNELHEDEN EN OPTIMALISATIE VAN INCUBATIES

Teneinde succesvolle incubaties met verontreinigde grond uit te kunnen voeren is het zinvol om een indruk te hebben van de endogene microbiële activiteit in zowel de entmaterialen als de verontreinigde grond alsmede van de factoren die deze activiteit beïnvloeden. Bij proef-incubaties kan ook de ontwikkeling van microbiële- en enzymactiviteit in de tijd gevolgd worden. Een van de bepalende parameters voor incubaties over een langere tijdsperiode is het vochtgehalte.

C. INCUBATIES ONDER OPTIMALE CONDITIES GEDURENDE 2 MAANDEN

Na vaststellen van de optimale condities kan uiteindelijk het experiment uitgevoerd worden waarbij de verontreinigde grond gemengd met de verschillende entmaterialen gedurende twee maanden geïncubeerd wordt bij een constante temperatuur en vochtgehalte. Er is gekozen voor een periode van twee maanden aan de hand van vergelijkbaar, in de literatuur beschreven, onderzoek.

2. UITVOERING

2.1 Bereiding van mengsels (uitgevoerd door het Proefstation)

Drie soorten grond, vervuild met respectievelijk HCH, DDT en dioxinen/planaire CB's, zijn gemengd in de verhouding 1: 1: 3. Deze mengverhouding is tot stand gekomen in overleg met het RIKILT. Het mengen is gebeurd door de gronden laagje voor laagje in een bak te strooien en vervolgens tenminste drie maal te zeven met behulp van een kist met spleten in de bodem. Vervolgens is het grondmengsel nog twee maal omgeschept.

Als entmaterialen zijn gebruikt: "champost" (residu teelt *Agaricus bisporus*) en *Pleurotus* teeltresidu, beide zowel onbehandeld als gestoomd. Voor het mengen met de vervuilde grond worden de materialen eerst gehomogeniseerd met een cutter. Een volume van 2,5 liter grond wordt vervolgens gemengd met een gelijk volume entmateriaal. Van elk mengsel is de gewichtsverhouding grond - entmateriaal bepaald (Tabel 1). De mengsels zijn gemaakt op 7 oktober 1997 en meteen in de koelcel geplaatst. De mengsels zijn op 21 oktober 1997 naar Nijmegen gebracht. Van elk mengsel en van de vervuilde grond is een monster van 100 g genomen en ingevroren, dit ten behoeve van analyses door het RIKILT. Naast de vier grond-entmateriaal mengsel zijn ook de afzonderlijke componenten beschikbaar voor metingen.

Tabel 1. Gewichtsverhouding mengsels

Mengsel nr.	Vervuilde grond (g)	Entmateriaal	Gewicht (g)
2	2003	Champost	1560
3	2006	Champost gestoomd	1605
4	2014	Pleurotus residu	919
5	2011	Pleurotus residu gestoomd	994

2.2 Bepaling metabole activiteit

De metabole activiteit van monsters wordt bepaald aan de hand van de CO₂ productie. De hoeveelheid geproduceerd CO₂ wordt gemeten m.b.v. een gaschromatograaf uitgerust met een geleidbaarheidsdetector. De incubaties worden uitgevoerd in 250 ml serumflessen met hoeveelheden variërend van 10 tot 50 g. Voor de CO₂ analyses worden monsters van 0,5 ml gebruikt. De incubaties zijn uitgevoerd bij verschillende temperaturen en vochtgehalte.

2.3 Meting van enzymactiviteiten

Aan 10 g monster (grond, entmateriaal of mengsel) wordt 15 ml water toegevoegd. Vervolgens wordt 20 min geschud bij 150 rpm. Na centrifugatie (20 min, 30.000 x g) wordt het heldere supernatant gebruikt voor enzymmetingen. De laccase activiteit wordt bepaald aan de hand van

de oxidatie van N,N-dimethyl-phenylenediamine tot een rood quinon product, dat spectrofotometrisch bepaald kan worden bij 552 nm. Mn-afhankelijke peroxidase activiteit wordt bepaald m.b.v. phenolrood. De oxidatie van deze verbinding kan gevolgd worden bij 431 nm. De ligninase activiteit wordt bepaald aan de hand van de oxidatie van de kleurstof Azure B die weerspiegeld wordt door een afname van de extinctie bij 615 nm.

2.4 Opstelling voor de incubatie gedurende 2 maanden

Een viertal dubbelwandige glazen kolommen (inhoud \pm 1,5 l) werden gevuld met 500 g van de mengsels 2 t/m 5 (zie foto's). Het materiaal wordt gestapeld op een bed van grote glaspereels. De kolommen bevinden zich in een broedstovf die op een constante temperatuur van 25°C wordt gehouden. Via een flowmeter wordt een constante luchtstroom van onder uit door de kolommen geleid. Voordat de lucht door de kolommen gaat wordt hij op temperatuur gebracht en verzadigd met water om uitdroging te voorkomen. Om de microbiële activiteit te kunnen volgen werd van de uittredende lucht de CO₂ concentratie gemeten met behulp van een doorstroommeter. Tijdens de incubatie-periode is op verschillende tijdstippen een monster van 10 g genomen om enzymmetingen uit te kunnen voeren. Na afloop van de incubatie-periode is de inhoud van de kolommen goed gemengd. Vervolgens werden monsters genomen voor bepaling van droge stof en asgehalte. De rest van de inhoud van de kolommen is op 16 maart 1998 opgehaald door dhr. Traag (RIKILT). Het effect van de incubaties op de chemische verontreiniging van de gronden zal blijken uit analyses van monsters van tijdstip 0 vergeleken met die van tijdstip 2 maanden.

2.5 Bepaling van het gehalte aan gechlloreerde verbindingen

Van de door het proefstation bereide monsters (verontreinigde grond gemengd met de verschillende entmaterialen) zijn voor aanvang van de experimenten door de KUN submonsters genomen. Deze monsters zijn tegelijkertijd met de op 16 maart 1998, bij de KUN, opgehaalde monsters in bewerking genomen. Het betreft de volgende monsters:

- verontreinigde grond gemengd met champost op tijdstip 0 maanden in vijfvoud
- verontreinigde grond gemengd met champost op tijdstip 2 maanden in vijfvoud
- verontreinigde grond gemengd met pleurotus residu op tijdstip 0 maanden in vijfvoud
- verontreinigde grond gemengd met pleurotus residuen op tijdstip 2 maanden in vijfvoud

Daarnaast zijn ter controle van het uitgevoerde experiment de volgende monsters geanalyseerd:

- verontreinigde grond op tijdstip 0 maanden in enkelvoud
- verontreinigde grond gemengd met champost op tijdstip 0 maanden doodgestoomd in enkelvoud
- verontreinigde grond gemengd met pleurotus residu op tijdstip 0 maanden doodgestoomd in enkelvoud

Tenslotte zijn ter controle van de gehele analysegang de volgende Quality Assurance (QA) monsters geanalyseerd:

- blanco grond
- blanco grond gespiked met HCHs, DDTs, PCBs en dioxinen in viervoud

Na het homogeniseren van de monsters is een deel in bewerking genomen conform NEN norm 5734.

Om het kwantitatieve aspect zo goed mogelijk uit te voeren is er gebruik gemaakt van de zogenaamde isotoop verdunningsmethode. Aan het te onderzoeken monster is een exact bekende hoeveelheid van een gelabelde verbinding toegevoegd. Aangenomen wordt dat deze gelabelde verbinding zich fysisch/chemisch identiek gedraagt aan de te onderzoeken verbinding waardoor er, per monster, aan de hand van de respons van de gelabelde verbinding eenvoudig gecorrigeerd

kan worden voor eventuele verliezen van de te bepalen componenten. Uit iedere groep van de te analyseren componenten is minimaal één gelabelde interne standaard toegevoegd. Voor de bepaling van de dioxinen zijn vijftien gelabelde interne standaarden toegevoegd.

Na extractie met een organisch oplosmiddel conform NEN 5734 is het extract na concentreren gezuiverd met behulp van gelpermeatie chromatografie (GPC) waarbij een scheiding plaatsvindt op grond van molecuulgrootte. De fractie die de te bepalen componenten bevat is uitgevangen en na concentratie is een aliquot geanalyseerd met behulp van gaschromatografie en hoog oplossend vermogen massaspectrometrie. Dit aliquot is driemaal geanalyseerd onder verschillende massaspectrometrische instellingen voor respectievelijk de HCH's, DDT's en PCB's. Vervolgens is de rest van het geconcentreerde extract verder gezuiverd over een koolkolom. Hierbij wordt een scheiding bewerkstelligt tussen dioxinen en de andere organische microverontreinigingen.

De dioxinen bevattende fractie is tenslotte drooggedampt en opgenomen in 10 µl toluen en geanalyseerd met behulp van gaschromatografie en hoog oplossend vermogen massaspectrometrie.

3. RESULTATEN

3.1 Droge stof analyses

Van de grond, de entmaterialen en van de mengsels is een droge stof analyse uitgevoerd. Vervolgens zijn de monsters verast (4 uur, 550°C) om het organische stof gehalte vast te stellen (Tabel 2). De waarden voor de mengmonsters (2 t/m 5) zijn berekend aan de hand van de analyses van de individuele componenten (1 en 6 t/m 9) en de gegevens uit Tabel 1. Door het mengen van de grond met de entmaterialen, die hoge gehalten organische stof bevatten, wordt in de mengsels een organisch stof gehalte van 17 tot 22 % bereikt. Dit is ongeveer een verdrievoudiging van het gehalte ten opzichte van de vervuilde grond.

Tabel 2. Vocht, droge stof samenstelling en pH

Nr.	Monster	Vocht	Droge stof	Organische stof	As	pH
		(% van totaal gewicht)	(% van droge stof)	(% van droge stof)		
1	Grond	22,5	77,5	7,0	93,0	
2	Grond + champost	40,0	60,0	22,5	77,5	
3	Grond + champost + stoom	40,4	59,6	22,8	77,2	
4	Grond + pleurotus	39,0	61,0	17,1	82,9	
5	Grond + pleurotus + stoom	40,2	59,8	17,6	82,4	
6	Champost	62,5	37,5	63,6	36,4	6,5
7	Champost + stoom	62,7	37,3	64,0	36,0	6,8
8	Pleurotus	75,3	24,7	86,9	13,1	4,9
9	Pleurotus + stoom	76,0	24,0	86,8	13,2	4,3

* De pH werd bepaald door aan 10 g monster 20 ml leidingwater toe te voegen. Na schudden werd de pH gemeten.

3.2 Bepaling van de metabole activiteit

Van de vervuilde grond en van de entmaterialen is de metabole activiteit vastgesteld aan de hand van de CO₂ productie bij kamertemperatuur. De resultaten zijn weergegeven in Fig. 1.

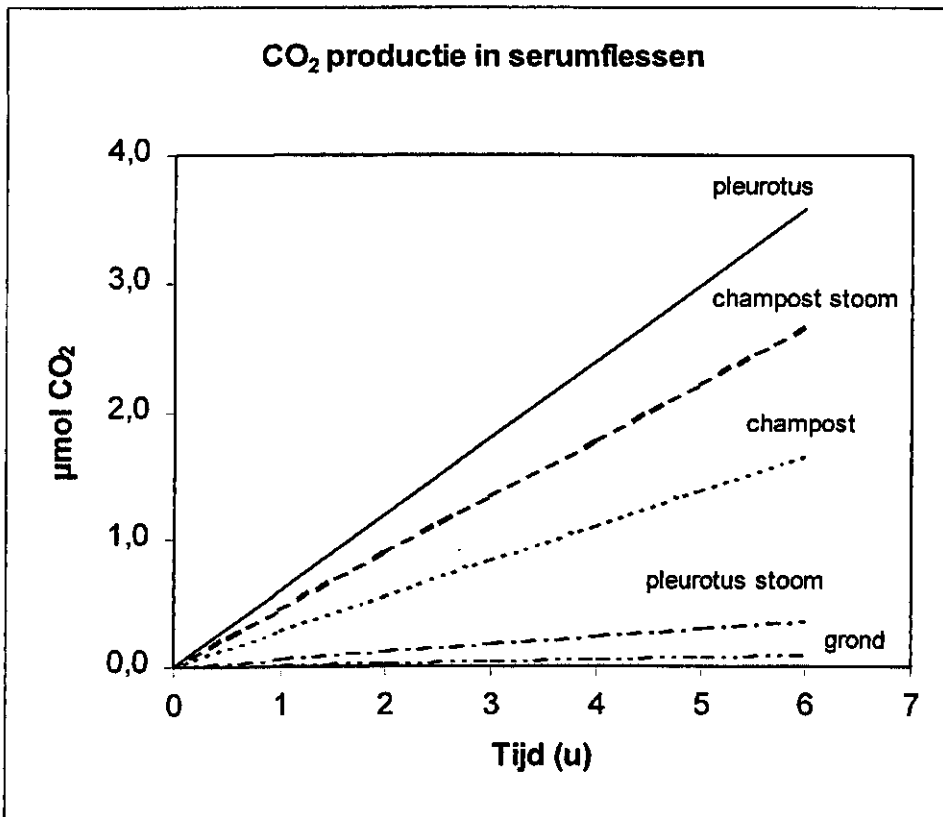


Fig. 1. CO₂ productie door grond en entmaterialen in serumflessen

De respiratiesnelheid en dus de metabole activiteit van de vervuilde grond is heel laag. Het pleurotus residu heeft de hoogste respiratiesnelheid. De stoombehandeling van dit materiaal leidt tot een sterke afname van de snelheid. Opvallend is dat de met stoom behandelde champost een hogere metabole activiteit vertoont dan de niet behandelde. De stoom behandelingen hebben tot doel de schimmels (*Pleurotus* c.q. *Agaricus*) af te doden en maken het materiaal dus zeker niet steriel. Na langer bewaren is ook bij het met stoom behandelde pleurotus residu weer een toename van de activiteit vast te stellen.

Bij een volgend experiment werd de invloed van de temperatuur op de respiratiesnelheid gemeten. De resultaten zijn weergegeven in Fig. 2. Het beeld van Fig. 1 komt terug in Fig. 2. Indien slechts sprake zou zijn van metabole activiteit van de schimmels dan zou boven de 30 °C geen activiteit meer zichtbaar zijn. Uit de figuur blijkt dat de activiteit nog sterk toeneemt (pleurotus) of gelijk blijft bij een temperatuur van 40 °C (champost + stoom, champost).

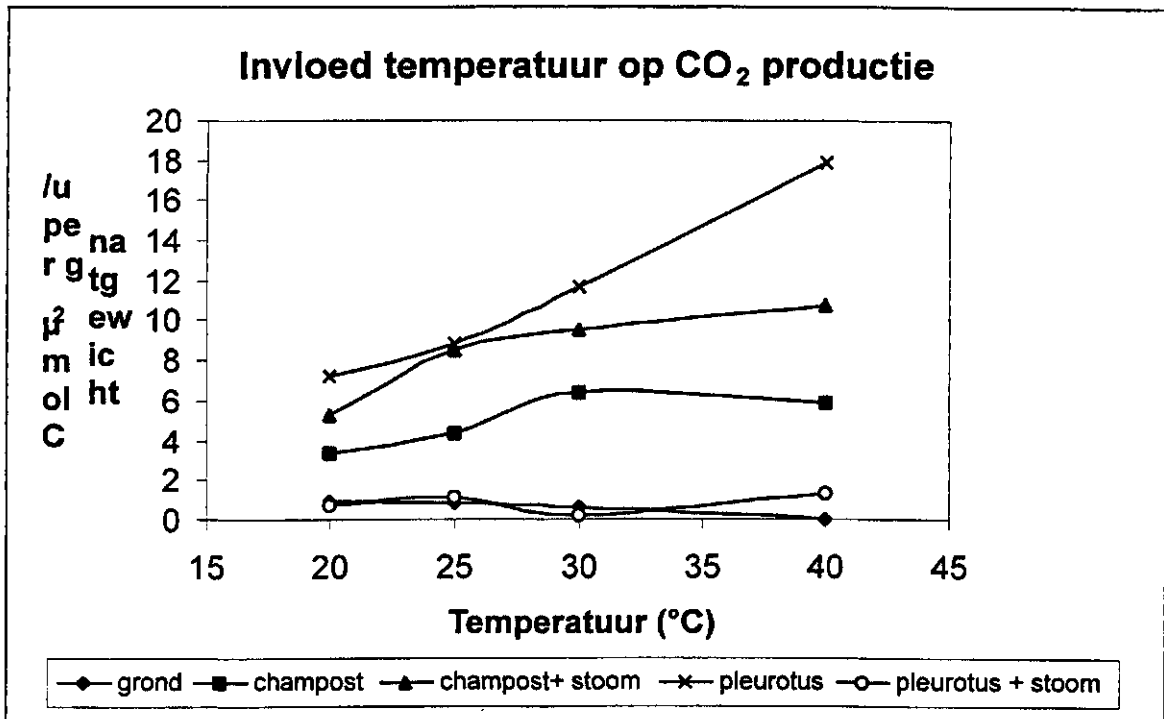


Fig. 2. Invloed van de temperatuur op de CO₂ productie

3.3 Invloed van vochtgehalte op de metabole activiteit

Van de niet gestoomde entmaterialen werd de invloed van toevoeging van extra water op de metabole activiteit bepaald (Tabel 3). Water toegevoegd aan het champost materiaal wordt niet opgenomen en er ontstaat een modderig mengsel. Bij het Pleurotus residu is een lichte toename te zien als het vochtgehalte verhoogd wordt van 75 naar 80%.

Tabel 3. Invloed van vochtgehalte op de metabole activiteit

Nr.	Monster	Vochtgehalte (%)	CO ₂ productie (mol/g/u)
6	Champost	63	2,31
		70	0,96
		75	0,62
8	Pleurotus residu	75	7,80
		80	11,51

3.4 Meting van enzymactiviteiten

Aan 10 g van de monsters 7 t/m 9 (zie Tabel 2) werd 15 ml water toegevoegd. Na centrifugatie worden enzym metingen uitgevoerd. Ligninase en Mn-peroxidase activiteit werden niet gevonden. De monsters vertoonden wel allemaal laccase activiteit. Om de invloed van incubatie van grond-entmateriaal mengsels op de laccase activiteit vast te stellen werden de monsters 2 t/m 4 gedurende 7 dagen geïncubeerd bij verschillende temperaturen (Tabel 4). Uit de metingen blijkt dat bij 20°C de activiteit in het champost/grond mengsel na 5 dagen met een factor 10 is afgenomen. Aan het einde van de incubatie is echter nog steeds laccase activiteit aanwezig. Verhoging van de incubatie temperatuur leidt tot een snellere afname van de activiteit. De laccase activiteit in de pleurotus/grond mengsels is veel stabiel. Bij 20°C is nauwelijks sprake van afname terwijl bij 30°C zelfs een toename wordt waargenomen. Incubatie bij 40°C zorgt aanvankelijk voor een afname, echter na 5 dagen is weer sprake van een toename.

Tabel 4. Invloed van incubatie op de laccase activiteit*

Nr.	Monster	Temperatuur (°C)	Incubatie duur (dagen)			
			1	3	5	7
2	Champost + grond	20	75,0	12,8	7,0	3,4
		30	75,0	5,7	2,8	1,7
		40	75,0	4,6	2,6	1,9
4	Pleurotus + grond	20	25,0	21,3	25,6	18,2
		30	25,0	95,0	60,0	60,6
		40	25,0	3,5	5,0	51,0

* De activiteit is uitgedrukt in $\Delta E_{552nm}/min/kg$

3.5 Incubatie van de mengsels gedurende 2 maanden

Op grond van de hierboven beschreven resultaten werd besloten om de incubaties in de glazen kolommen uit te voeren bij 25°C. Er werd geen extra vocht toegevoegd aan het mengsel. De lucht die voor beluchting van de kolommen werd gebruikt werd vooraf verzadigd met water om uitdroging van de mengsels te voorkomen. De kolommen werden gewogen om eventuele toch nog optredende uitdroging te kunnen corrigeren. Dit bleek uiteindelijk niet nodig. De luchtflow werd ingesteld op 4 liter lucht per uur en de kolommen werden gevuld met 500 g mengsel.

Kolom 1	champost + grond
Kolom 2	champost gestoomd + grond
Kolom 3	pleurotus residu + grond
Kolom 4	pleurotus residu gestoomd + grond

3.5.1. CO₂ productie van de kolommen

De CO₂ productie werd continu gemeten m.b.v. een CO₂ analyser. Het verloop van de CO₂ concentratie in de tijd is weergegeven in Fig. 3. De CO₂ concentratie in de uitredende lucht bij het begin van het experiment varieert voor de vier kolommen tussen de 0,4 en de 0,7 %. Hierbij zijn gestoomde residuen lager dan de niet-gestoomde. Na 1 week is de CO₂ concentratie ongeveer gehalveerd. Vanaf 14 dagen tot aan het einde van het experiment blijft de concentratie duidelijk boven de achtergrond waarde van 0,05 %.

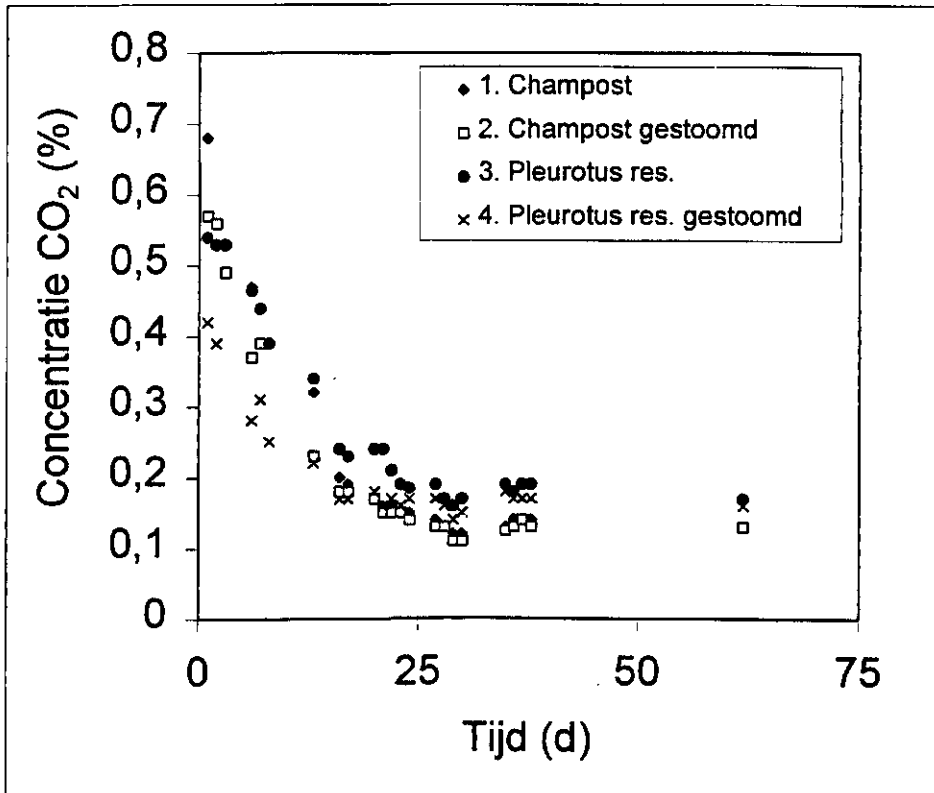


Fig. 3. Het verloop van de CO₂ concentratie in de tijd

3.5.2. Laccase activiteit in de kolommen

Op een viertal dagen werd van de vier kolommen een monster genomen en hiervan werd de laccase activiteit gemeten (Tabel 5). Deze gegevens zijn in overeenkomst met die van de CO₂ producties. De aanvankelijk hoge activiteit daalt aanzienlijk en blijft vervolgens stabiel.

Tabel 5. Laccase activiteit van de kolommen*

Dag	Kolom			
	1	2	3	4
0	105,0	244,0	16,0	138,0
13	2,1	3,7	6,0	15,8
27	1,7	1,8	2,2	3,3
56	2,4	2,3	2,6	2,0

* De activiteit is uitgedrukt in $\Delta E_{552nm}/min/kg$

3.5.3. Organische stof analyse van de inhoud van de kolommen

Na afloop van het experiment werden monsters genomen om de veranderingen in de hoeveelheid organische stof vast te stellen. De monsters werden eerst gedroogd en vervolgens verast. In Tabel 6 is het oorspronkelijk as- en organische stof gehalte vergeleken met dat na 2 maanden incuberen. Indien nu aangenomen wordt dat de as-hoeveelheid constant is gebleven kan berekend worden hoeveel organische stof is afgebroken. De resultaten van deze berekeningen zijn weergegeven in de laatste kolom. Hieruit wordt duidelijk dat er een grote hoeveelheid organische stof is afgebroken (31 - 37 %).

Tabel 6. As- en organische stof gehalte van de inhoud van de kolommen*

Kolom	Monster	Begin experiment		Na 2 maanden		Afbraak OS (%)
		OS	As	OS	As	
1	Grond + champost	22,5	77,5	15,8	84,2	35,3
2	Grond + champost + stoom	22,8	77,2	15,7	84,3	37,0
3	Grond + pleurotus	17,1	82,9	12,1	87,9	33,5
4	Grond + pleurotus + stoom	17,6	82,4	12,8	87,2	31,0

* Waarden uitgedrukt in % van de droge stof. OS = organische stof.

3.6 Gehalte aan organische microverontreinigingen

Voordat de monsters zijn gemeten is eerst voor iedere component een vijfpunts ijklijn opgesteld (zie RIKILT rapport 98.01). Het gehalte aan iedere component in de monsters is met behulp van de isotoop verdunningsmethode berekend ten opzichte van deze ijklijn.

In Tabel 7 zijn de resultaten van de meting voor verontreinigde grond gemengd met champost gegeven. In de eerste kolom zijn de namen van de gemeten componenten genoemd. Vervolgens zijn in de volgende vijf kolommen de analyseresultaten van de deelmonsters 2A t/m 2E op tijdstip 0 (dus direct na bereiding door het proefstation) gegeven. Ook is het gemiddelde en de bijbehorende standaardafwijking vermeldt. Vervolgens zijn de resultaten van deelmonsters afkomstig van tijdstip 2 (dus twee maanden na het door de KUN uitgevoerde experiment) vermeld. Deze monsters zijn eveneens 2A t/m 2E gecodeerd. In Tabel 8 is het resultaat gegeven van het mengmonster grond geënt met pleurotus residu. In Tabel 9 zijn de gehalten vermeld van het grondmonster zonder entmateriaal en van het grondmonster geënt met respectievelijke doodgestoomde champost en doodgestoomd pleurotus residu. Deze waarden kunnen, alhoewel de meting in enkelvoud uitgevoerd is, gebruikt worden ter controle van het experiment.

Ter controle van de gehele analysegang zijn vier monsters bosgrond welke artificieel zijn verontreinigd met de te onderzoeken componenten eveneens geanalyseerd. Tevens is een monsters bosgrond zonder toevoeging in enkelvoud geanalyseerd. In het monster bosgrond konden de te bepalen componenten niet boven de detectiegrens aangetoond worden. De gehalten in de vier controlemonsters lagen binnen de gestelde norm.

De resultaten zoals vermeld in Tabel 7 en in Tabel 8 zijn statistisch geëvalueerd. Uit deze evaluatie kan geconcludeerd worden dat er geen afbraak in de tijd heeft plaatsgevonden. Het toevoegen van champost of pleurotus residu aan grond, welke is verontreinigd met HCH, DDT, PCB of dioxinen, geeft geen bijdrage in de afbraak van deze verbindingen.

4. CONCLUSIES

- Uit de geconstateerde afbraak van organische stof en de productie van CO₂ tijdens de twee maanden waarin de grondkolommen geïncubeerd werden (KUN) kan geconcludeerd worden dat er, onder de gehanteerde omstandigheden te weten een temperatuur van 25°C, een luchtflow van 4 liter per uur en een constant vochtgehalte, voldoende biologische activiteit is geweest.
- Bij de experimenten is gebruik gemaakt van een mengsel van drie verschillende verontreinigde gronden. Aan het mengmonster werden geen extra verontreinigingen toegevoegd. Uit de door RIKILT-DLO uitgevoerde metingen kan geconcludeerd worden dat in het mengmonster verontreinigde grond waaraan of champost of pleurotus residu was toegevoegd er, onder optimale omstandigheden, geen biodegradatie plaatsvindt van HCH, DDT, PCB's en dioxinen.

5. AANBEVELINGEN

Gezien de gemeten resultaten lijkt het niet zinvol om het onderzoek naar gebruik van residuen uit de commerciële paddenstoelenkweek te continueren. Bij eventueel gebruik van andere schimmelsoorten is het zeer aan te bevelen om de in dit onderzoek gebruikte grond als referentie mee te nemen. Toevoeging van "zuivere" verontreinigingen aan "schone" grond kan gemakkelijk een verkeerd beeld veroorzaken over toepassingsmogelijkheden. Het bij het huidige onderzoek gebruikte mengmonster bevat een redelijke hoeveelheid verontreinigingen.

Component	Tijdstip t=0					Tijdstip t=2					Gem		
	2A	2B	2C	2D	2E	Gem	Std	2A	2B	2C		2D	2E
alpha-HCH	0,96	0,83	0,75	0,21	0,62	0,67	0,29	2,06	5,00	0,99	*	2,60	2,66
beta-HCH	9,39	9,13	6,89	4,91	6,31	7,28	1,92	16,04	21,44	10,05	*	19,83	16,84
gamma-HCH	0,014	0,022	0,012	0,006	0,009	0,013	0,006	0,000	0,000	0,012	*	0,000	0,003
delta-HCH	0,033	0,040	0,031	0,026	0,033	0,033	0,005	0,055	0,000	0,047	*	0,069	0,043
epsilon-HCH	0,025	0,030	0,022	0,018	0,024	0,024	0,005	0,047	0,000	0,023	*	0,061	0,033
o,p-DDE	0,003	0,002	0,003	0,002	0,004	0,003	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002
p,p-DDE	0,081	0,102	0,077	0,096	0,105	0,092	0,012	0,088	0,080	0,086	0,088	0,080	0,086
o,p-TDE	0,015	0,020	0,013	0,017	0,020	0,017	0,003	0,015	0,014	0,014	0,018	0,014	0,015
p,p-DDT	0,23	0,33	0,23	0,25	0,34	0,27	0,05	0,26	0,24	0,22	0,28	0,22	0,24
PCB-28	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,012	0,013	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
PCB-52	0,003	0,019	0,003	0,003	0,031	0,012	0,013	0,010	0,003	0,006	0,029	0,004	0,010
PCB-101	0,015	0,062	0,014	0,011	0,192	0,059	0,077	0,036	0,011	0,032	0,154	0,019	0,050
PCB-118	0,007	0,042	0,006	0,006	0,066	0,025	0,028	0,027	0,006	0,014	0,060	0,009	0,023
PCB-138	0,018	0,063	0,018	0,014	0,274	0,077	0,112	0,045	0,017	0,045	0,237	0,025	0,074
PCB-153	0,014	0,044	0,013	0,010	0,209	0,058	0,085	0,029	0,012	0,033	0,183	0,018	0,055
PCB-180	0,009	0,025	0,009	0,007	0,154	0,041	0,064	0,015	0,008	0,021	0,112	0,011	0,034
2,3,7,8-TCDF	4,39	7,13	5,62	4,96	7,12	5,84	1,25	6,80	**	5,84	7,57	7,01	6,80
2,3,7,8-TCDD	<0,001	0,16	0,09	0,37	0,13	0,19	0,125	0,33	**	0,10	*	0,34	0,26
1,2,3,7,8-PeCDF	2,36	4,04	*	2,62	5,13	3,54	1,29	17,40	**	27,23	6,00	32,11	20,69
2,3,4,7,8-PeCDF	4,73	6,89	2,43	4,78	9,73	5,71	2,74	*	**	6,29	4,37	5,33	5,33
1,2,3,7,8-PeCDD	0,25	0,48	1,17	0,67	0,39	0,59	0,36	0,40	**	0,96	0,26	1,12	0,69
1,2,3,4,7,8-HxCDF	19,23	17,59	17,26	22,34	293,35	73,95	122,67	14,25	**	21,21	216,92	27,27	69,91
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5,18	5,57	4,75	5,99	43,25	12,95	16,95	*	**	6,02	26,61	6,50	13,04
2,3,4,6,7,8-HxCDF	5,80	7,98	6,13	6,90	40,39	13,44	15,09	7,67	**	8,14	33,35	0,00	12,29
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	2,52	0,30	<0,001	**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	*	2,68	2,18	*	2,73	11,2	1,0	12,6	**	10,0	*	*	11,3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	*	12,5	10,2	10,9	11,0	4,57	0,67	*	**	3,13	*	3,40	3,26
1,2,3,7,8,9-HxCDD	*	5,24	3,90	*	4,55	117,0	128,8	66,4	**	60,2	346,1	45,2	129,5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	52,1	62,5	60,3	62,7	347,3	43,4	65,2	0,0	**	*	*	16,8	8,4
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	*	12,0	10,4	10,0	141,2	621	150	833	**	678	765	458	683
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	508	811	493	538	755	292	58	257	**	*	*	220	238
OCDF	348	333	263	226	*	8948	2513	8948	**	*	*	6465	7707
OCDD	12324	10343	7375	7060	*	288	323	211	**	176	428	155	243
3,4,3,4-PCB	108	859	126	121	225	22,9	21,8	11,9	**	12,7	41,6	11,0	19,3
3,4,3,4,5-PCB	7,8	58,1	9,0	9,1	30,6	<0,001	<0,001	<0,001	**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
3,4,5,3,4,5-PCB	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	30,2	15,4	24,1	**	14,7	47,1	21,6	26,9
Totaal TEQ dioxinen	24,3	27,6	20,2	21,7	57,4	2,45	2,33	1,29	**	1,36	4,37	1,17	2,05
Totaal TEQ planaire CB's	0,84	6,24	0,99	1,00	3,17	30,2	15,4	24,1	**	14,7	47,1	21,6	26,9

* = Signaal voldoet niet aan de gestelde criteria of signaal is geïnterfereerd

** = Monster mistukt

Tabel 8: Verontreinigde grond gemengd met pleurotits

Gehalten HCH's, DDT's en PCB's in mg/kg
 Gehalten dioxinen en planaire CB's in ng/kg

	Tijdstip t=0					Tijdstip t=2							
	4A	4B	4C	4D	4E	Gem	Std	4A	4B	4C	4D	4E	Gem
alpha-HCH	0,50	3,76	0,28	0,21	1,10	1,17	1,49	0,52	1,73	0,69	*	1,33	1,06
beta-HCH	11,1	14,9	5,3	5,8	9,8	9,4	4,0	9,5	15,3	11,8	*	10,2	11,7
gamma-HCH	0,013	0,061	0,014	0,007	0,016	0,022	0,022	0,016	0,025	0,021	*	0,028	0,023
delta-HCH	0,051	0,092	0,151	0,035	0,051	0,076	0,047	0,058	0,062	0,072	*	0,088	0,070
epsilon-HCH	0,045	0,090	0,022	0,023	0,035	0,025	0,017	0,039	0,052	0,047	*	0,045	0,046
o,p-DDE	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,000	0,002	0,003	0,002	0,004	0,001	0,002
p,p-DDE	0,105	0,102	0,102	0,096	0,113	0,104	0,006	0,110	0,105	0,123	0,102	0,086	0,105
o,p-TDE	0,019	0,017	0,017	0,017	0,018	0,018	0,001	0,017	0,016	0,020	0,014	0,014	0,016
p,p-DDT	0,30	0,26	0,28	0,26	0,29	0,28	0,019	0,31	0,31	0,36	0,26	0,25	0,30
PCB-28	<0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	0,001
PCB-52	0,004	0,005	0,004	0,009	0,007	0,006	0,002	0,003	0,010	0,006	0,005	0,005	0,006
PCB-101	0,015	0,020	0,015	0,040	0,040	0,026	0,013	0,014	0,047	0,021	0,018	0,019	0,024
PCB-118	0,009	0,011	0,008	0,022	0,015	0,013	0,006	0,007	0,033	0,016	0,010	0,009	0,015
PCB-138	0,020	0,026	0,020	0,057	0,071	0,039	0,024	0,019	0,063	0,026	0,022	0,022	0,031
PCB-153	0,013	0,018	0,015	0,040	0,056	0,029	0,019	0,013	0,043	0,018	0,015	0,016	0,021
PCB-180	0,008	0,011	0,009	0,024	0,043	0,019	0,015	0,009	0,034	0,010	0,009	0,011	0,015
2,3,7,8-TCDF	6,62	6,69	6,93	6,82	7,35	6,88	0,29	*	*	6,84	5,74	*	6,29
2,3,7,8-TCDD	0,130	0,280	0,260	<0,001	0,130	0,200	0,081	0,876	0,280	0,340	*	0,340	0,459
1,2,3,7,8-PeCDF	2,44	*	*	*	2,63	2,53	0,13	14,29	0,00	24,85	11,23	22,42	14,56
2,3,4,7,8-PeCDF	4,94	3,75	2,38	4,63	8,23	4,79	2,17	*	5,00	*	*	7,96	6,48
1,2,3,7,8-PeCDD	0,77	1,54	1,45	0,61	1,04	1,08	0,41	0,72	0,84	0,41	1,30	0,78	0,81
1,2,3,4,7,8-HxCDF	13,7	17,1	14,6	52,5	48,9	29,4	19,6	13,5	23,6	14,4	13,5	13,6	15,8
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4,55	4,94	4,29	8,94	9,26	6,39	2,48	*	5,96	4,50	*	*	5,23
2,3,4,6,7,8-HxCDF	7,70	7,01	7,44	11,77	9,46	8,67	1,96	6,06	7,55	6,35	5,46	5,80	6,24
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	*	4,55	*	*	*	4,55	*	2,91	*	3,44	3,91	*	3,42
1,2,3,6,7,8-HxCDD	15,15	14,55	16,24	14,50	13,69	14,83	0,95	13,15	12,49	10,50	12,80	0,00	9,79
1,2,3,7,8,9-HxCDD	6,35	6,40	0,00	4,75	0,00	3,50	3,26	5,25	5,09	4,77	0,00	0,00	3,02
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	55,9	71,0	64,3	93,7	77,9	72,6	14,3	45,3	58,8	46,1	41,0	44,6	47,2
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	10,41	0,00	8,03	28,09	19,05	13,12	10,78	8,57	0,00	7,31	0,00	12,99	5,77
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	830	859	941	754	647	806	112	505	780	537	645	586	611
OCDF	220	183	396	*	*	287	114	258	272	238	257	179	241
OCDD	7988	7019	14059	*	*	9689	3816	8567	9563	8030	8976	5976	8222
3,4_3,4_PCB	160	139	140	199	163	160	24	139	478	187	157	152	223
3,4_3,4,5-PCB	11,02	11,65	10,60	15,34	21,14	13,95	4,44	7,65	30,96	11,32	9,54	9,48	13,79
3,4,5_3,4,5-PCB	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Totaal TEQ dioxinen	25,7	25,5	31,7	21,3	21,2	25,1	4,3	20,4	26,9	21,0	21,4	20,4	22,0
Totaal TEQ planaire CB's	1,18	1,23	1,16	1,66	2,25	1,50	0,47	0,83	3,34	1,25	1,05	1,05	1,50

Tabel 9: Controlemonsters

Gehalten HCH's, DDT's en PCB's in mg/kg
 Gehalten dioxinen en planaire CB's in ng/kg

	1	3	5
alpha-HCH	0,79	0,72	1,03
beta-HCH	11,1	7,1	9,6
gamma-HCH	0,016	0,011	0,000
delta-HCH	0,034	0,038	0,041
epsilon-HCH	0,030	0,024	0,033
o,p-DDE	0,006	0,002	0,003
p,p-DDE	0,180	0,092	0,100
o,p-TDE	0,035	0,017	0,017
p,p-DDT	0,608	0,323	0,385
PCB-28	0,000	0,000	0,000
PCB-52	0,006	0,004	0,003
PCB-101	0,029	0,017	0,015
PCB-118	0,015	0,009	0,008
PCB-138	0,037	0,023	0,019
PCB-153	0,028	0,017	0,015
PCB-180	0,017	0,010	0,009
2,3,7,8-TCDF	12,8	6,9	5,8
2,3,7,8-TCDD	0,45	0,14	0,33
1,2,3,7,8-PeCDF	0,00	0,00	2,31
2,3,4,7,8-PeCDF	4,87	5,25	4,29
1,2,3,7,8-PeCDD	0,00	0,00	0,44
1,2,3,4,7,8-HxCDF	36,2	24,3	12,4
1,2,3,6,7,8-HxCDF	12,9	5,5	4,0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	16,0	7,0	6,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0,001	<0,001	<0,001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	<0,001	<0,001	<0,001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	18,8	11,4	10,8
1,2,3,7,8,9-HxCDD	8,6	4,9	*
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	99,1	68,5	69,4
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	31,3	17,0	7,2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1007	812	548
OCDF	611	286	230
OCDD	21293	9546	8668
3,4_3,4_PCB	218	121	129
3,4_3,4,5-PCB	18,04	9,87	8,18
3,4,5_3,4,5-PCB	<0,001	<0,001	<0,001
Totaal TEQ dioxinen	46,7	27,3	21,9
Totaal TEQ planaire CB's	1,91	1,05	0,90

1: GRONDMENGSEL

3: GRONDMENGSEL + GESTOOMDE CHAMPOST

5: GRONDMENGSEL + GESTOOMD PLEUROTUSSUBSTRAAT