V31545.1759

BIBLIOTHEEK
STARINGGEBOUW

ICW nota 1759

januari 1987

nota

instituut voor cultuurtechniek en waterhuishouding, wageningen

AFBRAAK VAN OLIE EN OLIEKOMPONENTEN DOOR MIKRO-ORGANISMEN

Verslag van een onderzoek naar de afbraak van olie in grond en naar de afbraak van onder andere naftaleen door een reinkulture

A. Boekhold

Nota's van het Instituut zijn in principe interne communicatie-middelen, dus geen officiële publikaties.
Hun inhoud varieert sterk en kan zowel betrekking hebben op een eenvoudige weergave van cijferreeksen, als op een concluderende discussie van onderzoeksresultaten. In de meeste gevallen zullen de conclusies echter van voorlopige aard zijn omdat het onderzoek nog niet is afgesloten.
Bepaalde nota's komen niet voor verspreiding buiten het Instituut in aanmerking

29 APR. 1987

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS
0000 0227 1993

257188

Voorwoord

In dit verslag wordt een 9-maands doktoraalonderzoek Mikrobiologie beschreven, dat uitgevoerd is in het kader van mijn studie Biologie aan de Rijks Universiteit van Utrecht (RUU). Het onderzoek werd uitgevoerd als stage bij het Instituut voor kultuurtechniek en Waterhuishouding (ICW) te Wageningen in de periode juni 1985 - april 1986. Van daaruit werd het begeleid door dr.ir.J.Hoeks. Vanuit de vakgroep Mikrobiologie van de Landbouwhogeschool te Wageningen (LHW) werd het onderzoek begeleid door dr.ir.J.L.M.Huntjens. De analytische kant van het onderzoek is begeleid door J.Harmsen, hoofd van het Waterkwaliteitslaboratorium van het ICW.
In dezelfde periode werd door A.E.Boekhold in het kader van haar studie Bodemverontreiniging aan de LHW een 6-maands doktoraalonderzoek Mikrobiologie uitgevoerd , tevens als stage bij het ICW, dat nauw verbonden is met het door mij uitgevoerde onderzoek. Graag maak ik van deze gelegenheid gebruik haar te bedanken voor de prettige samenwerking en de ondersteuning bij mijn onderzoek. Tevens wil ik alle mensen die verder bijgedragen hebben aan de totstandkoming van dit onderzoek van harte bedanken. Met name de mensen die werkzaam zijn op het laboratorium van de afdeling Waterkwaliteit, die steeds bereid waren waar nodig geestelijke en materiële hulp te verlenen, evenals de reeds eerder genoemde begeleiders van dit onderzoek.

Utrecht, 14 mei 1986.

A.J.Boekhold

INHOUD: pagina

Voorwoord 1

1. Samenvatting 4

2. Inleiding 5

3. Literatuuronderzoek: Mikrobiologische aspekten van olie-afbraak 7

4. Effekten van temperatuur en grondbewerking op de afbraak van olie in grond 20

1. Inleiding 20

2. Materiaal en methoden 20

3. Resultaten 22

4. Diskussie en konklusies 26

5. Het effekt van mengen op de afbraak van olie in grond 29

1. Inleiding 29

2. Materiaal en methoden 29

3. Resultaten 30

4. Diskussie en konklusies 31

6. Eindkonklusies olieafbraak in grond en aanbevelingen 34

7. Literatuuronderzoek: Afbraak van naftaleen door mikro-organismen 36

8. Isolatie van een mikro-organisme dat groeit op naftaleen als enige koolstof- en energiebron 50

9. Groeisnelheid van de naftaleensplitsende bakterie 52

1. Inleiding 52

2. Metingen van de groeisnelheid m.b.v. extinktiemetingen 53

1. Inleiding 53

2. Materiaal en methoden 53

3. Resultaten groei op diverse substraten 54

4. Resultaten groei op naftaleen + diverse substraten 56

5. Resultaten groei op naftaleen bij diverse pH's 57

6. Overenten 59

7. Diskussie en konklusies 60

3. Metingen van de groeisnelheid m.b.v. meting van het O_2-verbruik 62

1. Materiaal en methoden 62

2. Resultaten 62

3. Diskussie en konklusies 65

	pagina
10. Afbraaksnelheid van naftaleen	66
1. inleiding	66
2. Materiaal en methode	66
3. Resultaten	67
4. Diskussie en konklusies	68
11. Afbraakprodukten bij groei op naftaleen	70
1. Materiaal en methoden	70
2. Resultaten	71
1. TOC-bepalingen bij diverse temperaturen	71
2. HPLC-bepalingen bij diverse temperaturen	71
3. TOC-bepalingen bij diverse pH's	74
4. HPLC-bepalingen bij diverse pH's	75
3. Diskussie en konklusies	76
12. Afbraak van anthraceen	77
1. Materiaal en methoden	77
2. Resultaten	78
3. Diskussie en konklusies	80
13. Eindkonklusies afbraak van naftaleen door een reinkulture	81

Bijlagen:

1. ICW-projekt Wijster	83
2. Gebruikte chemikaliën	85
3. Analysemethoden	86
4. Werking en inrichting van de sapromat	92

1. Samenvatting

In het kader van mijn doktoraalstudie aan de RUU is een 9-maands-vak Mikrobiologie gedaan aan de LUW. Het onderzoek is uitgevoerd als stage bij het ICW te wageningen.
Meegewerkt is aan laboratoriumonderzoek t.b.v. landfarming van met olie verontreinigde grond en is een onderzoek uitgevoerd naar de afbraak van naftaleen door een uit schone grond geïsoleerd mikro-organisme.
T.b.v. landfarming zijn de effekten van temperatuur, grondbewerking en mengen van 2 met olie verontreinigde gronden bestudeerd op afbraak-snelheid en het ontstaan van afbraakprodukten. Het is gebleken, dat hogere temperaturen en grondbewerking de afbraaksnelheid verhogen en de hoeveelheid afbraakprodukten verminderen. Ook het mengen van 2 met olie verontreinigde gronden leidde tot een grotere afbraak.
Het uit schone grond geïsoleerde mikro-organisme had tijdens groei op naftaleen bij 30° C een verdubbelingstijd van 2,6 uur, en reageerde op temperatuurverlaging met een Q_{10} van 3. Er ontstonden bij lagere temperaturen meer wateroplosbare afbraakprodukten, evenals bij een te hoge of te lage pH. Afbraak van anthraceen door het geïsoleerde mikro-organisme was vrijwel niet mogelijk, vluchtige aromaten konden niet worden afgebroken en in hoge konsentraties remden ze de groei van het mikro-organisme.'
Uit de resultaten van de experimenten is gebleken, dat milieufaktoren niet alleen de afbraaksnelheid van olie(komponenten) kunnen beïnvloeden, maar tevens invloed hebben op het ontstaan van wateroplosbare afbraakprodukten.

2. Inleiding

In Nederland komt vrij veel met olie of oliekomponenten verontreinigde grond voor. Eén van de saneringstechnieken voor met olie verontreinigde grond is landfarming. Dit is een methode waarbij de omstandigheden voor mikrobiologische afbraak van verontreinigende verbindingen worden geoptimaliseerd.

Er zijn veel mikro-organismen die in staat zijn om koolwaterstoffen af te breken. Al naar gelang de volledigheid van de afbraak ontstaan daarbij CO_2, H_2O, celmateriaal en afbraakprodukten. Het ontstaan van wateroplosbare afbraakprodukten kan na regenval leiden tot grondwaterverontreiniging. Zowel olie als afbraakprodukten van olie kunnen in lage konsentraties de geur en smaak van water behoorlijk aantasten.

Aan de andere kant kan landfarming van met olie verontreinigde grond de vruchtbaarheid van de grond verbeteren, vanwege de hoge mikrobiologische aktiviteit in de grond en de daarmee samenhangende aanwezigheid van nutriënten. Op deze wijze gesaneerde grond blijft voor meerdere doeleinden bruikbaar, dit in tegenstelling tot een aantal andere saneringstechnieken zoals verbranding.

De economische haalbaarheid van landfarming is afhankelijk van de afbraaksnelheid van de olie in de grond. Bij snelle afbraak is de terreinhuur per kubieke meter laag, en landfarming een goedkope saneringstechniek.

De afbraak van olie in grond wordt beïnvloed door faktoren als temperatuur, nutriëntenvoorziening, pH, zuurstofvoorziening, aanwezigheid van groeiremmende faktoren, bijv. toxische oliekomponenten, en de beschikbaarheid van de olie voor de mikro-organismen.

Ter ondersteuning van het ICW-projekt zijn laboratoriumexperimenten uitgevoerd om de effekten van temperatuur, grondbewerking en mengen van 2 met olie verontreinigde gronden op de afbraaksnelheid van olie in grond te onderzoeken, èn de effekten hiervan op het ontstaan van wateroplosbare afbraakprodukten.

Daarna is de afbraak van één oliekomponent - de polycyklische aromaat 'naftaleen' - door een reinkulture onderzocht onder diverse onstandigheden. Hierbij is tevens aandacht besteed aan het ontstaan van afbraakprodukten tijdens het afbraakproces, en de mogelijke afbraak van andere verbindingen.

Ter voorbereiding van beide onderzoeken zijn een tweetal literatuur-onderzoeken verricht. Vanwege het toch wel verschillende karakter van beide onderzoeken is de verslaglegging hiervan gesplitst in twee delen. In het eerst deel worden de experimenten met de olie verontreinigde grond beschreven, in het tweede deel de experimenten met de geïsoleerde naftaleensplitser.

3. Literatuuronderzoek: Mikrobiologische aspekten van olieafbraak.

Olie is een komplex mengsel van koolwaterstoffen. Koolwaterstoffen die in olie voor kunnen komen zijn: n-alkanen, vertakte alkanen, cycloalkanen, mono-aromaten, gekondenseerde aromaten, en komponenten met een gemengde struktuur. In olie en olieprodukten komen deze koolwaterstoffen in wisselende verhoudingen voor. Bij landfarming van met olie verontreinigde grond wordt gebruik gemaakt van het vermogen van mikro-organismen om koolwaterstoffen af te breken en te gebruiken als C- en energiebron.

In dit literatuuronderzoek worden een aantal eigenschappen van koolwaterstoffenafbrekende mikro-organismen behandeld en wordt aangegeven wat dat voor landfarming kan betekenen.

Er zijn meer dan 200 verschillende species van eukaryotische en prokaryotische koolwaterstoffen-afbrekende mikro-organismen beschreven. (Beerstecher, 1954; ZoBell, 1973)

Austin et al. (1977) hebben bakterieën geïdentificeerd die koolwaterstoffen kunnen benutten als C- en energiebron, bijvoorbeeld Pseudomonas, Actinomycetes, Micrococcus, Nocardia, etc. Uit sedimenten en zeewater geïsoleerde olieafbrekende bakterien bleken een aantal overeenkomstige eigenschappen te hebben. Van de geïsoleerde bakteriën waren er 63 % gekleurd, vooral oranje en geel, 3 % was rood; het merendeel was gram-negatief en staafvormig; 60 % kwam individueel voor, 10 % kwam vooral voor in paren; 32 % was beweeglijk.
Wat betreft de biochemische reakties: 98 % was katalase positief (katalase is betrokken bij de omzetting van O_2 naar $O^{\cdot}$); 74 % kon nitraat reduceren; 42 % kon nitriet reduceren; 49 % metaboliseerden glukose oxidatief, 26 % fermentief, 25 % groeide niet op glukose; 26 % produceerde oxidase ; 35 % kon ethanol oxideren.
Verder groeiden 52 % van de bakteriën bij 5^{o} C, 78 % bij 37^{o} C en 50 % bij 43^{o} C.

Uit met olie verontreinigde gebieden konden meer olieafbrekende soorten bakteriën worden geïsoleerd dan uit niet- verontreinigde gebieden.
Uit dit onderzoek blijkt, dat de meeste mikro-organismen O_2 gebruiken tijdens groei op koolwaterstoffen. Ongeveer de helft van de mikro-organismen kan nitraat gebruiken als N-bron, temperatuur beïnvloedt het aantal soorten dat koolwaterstoffen afbreekt en tweederde van de mikro-organismen is onbeweeglijk.

In een publikatie van Davies en Westlake (1979) worden een groot aantal schimmels genoemd, die in staat zijn om op olie te groeien, zoals Penicillium, Candida, Verticilium, etc. Deze schimmels zijn geïsoleerd uit zowel met olie verontreinigde als niet verontreinigde grond, maar geen van de schimmels kon groeien op tolueen, naftaleen of zware ruwe olie. Bij toevoeging van n-alkanen aan deze zware ruwe olie werd wèl groei gekonstateerd, hetgeen erop wijst, dat de zware ruwe olie niet toxisch is voor de schimmels.
95 % van de geteste schimmels kon groeien op n-tetradecaan, 80 % kon groeien op gewone ruwe olie. 75% van de geteste schimmels kon op zowel n-tetradecaan als op gewone ruwe olie groeien.
In 70 % van de groeitesten is er groei in en op de oliefase waargenomen en in 58 % van de testen kon de olie(komponent) via de lucht als substraat dienen voor de groei van schimmels.
Uit dit onderzoek blijkt, dat schimmels in de hydrofobe koolwaterstoffen kunnen binnendringen en daar kunnen groeien. Ook kan zo het oppervlak van de koolwaterstoffen worden vergroot, waardoor andere mikro-organismen meer kontaktvlak tot hun beschikking hebben. Schimmels kunnen via de luchtfase vervluchtigde oliekomponenten opnemen en erop groeien.

Scott en Finnerty (1976) beschrijven een onderzoek naar cytologische veranderingen van bakteriën en schimmels bij groei op koolwaterstoffen. Gebruikt zijn hexadekaan in waterig medium; hexadekaan, tetradekaan en naftaleen in dampvorm boven agarplaten.

Bij 90 % van de - elektronenmikroskopisch - onderzochte cellen bleken er voor elektronen ondoordringbare insluitsels in de cellen aanwezig te zijn, die bij groei op bouillon met gistextrakt niet aanwezig waren. Na intensief spoelen en centrifugeren, om geadsorbeerde koolwaterstoffen te verwijderen, konden er toch nog koolwaterstoffen uit de mikro-organismen geëxtraheerd worden met chloroform-methanol. De resultaten van de GLC-analyses zijn opgenomen in tabel 1.

Table 1 *Cellular hydrocarbon and PHB in the hydrocarbon-grown micro-organisms*

Organism	Cellular hydrocarbon (nmol/mg dry wt) Liquid*	Plate†	PHB
Acinetobacter sp. HO1-N	130	5	0
Pseudomonas sp. NP	8‡	--	0·13
Arthrobacter sp. Ro	--	60	0
Corynebacterium sp.	--	9	0·06
Mycobacterium strain 7E4	72	--	4·3
M. marinum, 2085	--	12	0·54
Nocardia sp. 72	--	1	0·07
Nocardia rubra	--	13	0·05
Candida lipolytica Pfaff	300	--	0·24
C. tropicalis	32‡	—	0·12
Bacillus megaterium KM	--	--	4100

* The organisms were grown in a basal salts medium containing the liquid hydrocarbon.
† The organisms were grown on a basal salts agar plate in the presence of hydrocarbon vapours.
‡ Intracellular hydrocarbon, expressed as nmol hydrocarbon per 0·01 g wet wt cells.

Bij een molekuulgewicht van 100 komt 100 nmol/mg drooggewicht overeen met 0,01 mg/mg drooggewicht, dat is 1 % .

De mikro-organismen blijken onafgebroken koolwaterstoffen te kunnen bevatten.

De cytologische reakties van de schimmel Cladosporium tijdens groei op kerosine is onderzocht door Smucker en Cooney (1981).
In een waterig medium met glukose groeiden de schimmelcellen 'vlokkig', in het medium met kerosine dreven de cellen en vormden kompaktere agregaten. Na 72 uur (pH=5,8) trad er in beide media sporevorming op. Geïsoleerde cellen werden onderzocht op katalase-aktiviteit en werden elektronenmikroskopisch onderzocht. Bij groei op kerosine waren er veranderingen zichtbaar aan de celwanden en de vakuolen. Er was een hogere katalase-aktiviteit. Enkele van de grote vakuolen bevatten kleine bolvormige voor elektronen ondoordringbare insluitsels, die niet aanwezig waren in glukose gekweekte cellen. Grote voor elektronen ondoordringbare lichaampjes in vakuolen werden in cellen van beide substraten aangetroffen.

Uit deze onderzoeken blijkt, dat mikro-organismen in hun vakuolen onafgebroken koolwaterstoffen kunnen hebben. Dit kan een substraatvoorraad zijn, maar ook een reaktie op de toxiciteit van de koolwaterstoffen. Er treden als gevolg van de aanwezigheid van bepaalde koolwaterstoffen veranderingen op in de celwand. Verder worden er mikrobodies en meer katalase gesynthetiseerd. Dit kan verklaard worden door het hogere zuurstofverbruik per mol verbinding bij de afbraak van koolwaterstoffen in vergelijking met glukose.

Neufeld et al. (1980) onderzochten bij Acinetobacter calcoaceticus het celoppervlak op olieminnendheid tijdens groei op hexadekaan of citraat. Hierbij zijn kontakthoekmetingen een maat voor de olieminnendheid. De groeikurve op beide substraten is weergegeven in figuur 2.

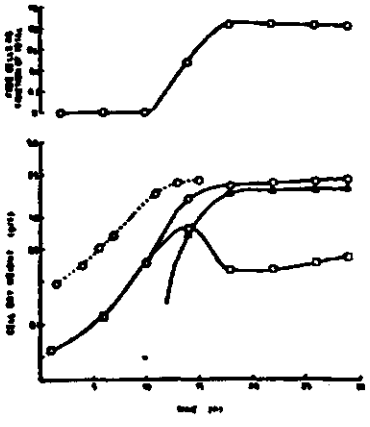


FIG. 2. *Growth of A. calcoaceticus on hexadecane (——) and sodium citrate (– – –). Upper curve represents the fraction of free (unbound) cells to the total cell population during growth on hexadecane. Total biomass (○) is compared with the concentration of cells bound to the hydrocarbon (□) and cells free in the aqueous phase (△).*

Tijdens de eerste 10 uur van de hexadekaanafbraak bleef de hele celpopulatie gebonden aan de koolwaterstoffase. Tijdens de groei direkt op de onopgeloste koolwaterstof werd er een hogere maximale specifieke groeisnelheid gemeten dat tijdens de groei op het opgeloste substraat (na 10 uur), resp. 0,40/uur en 0,23/uur. De exponentiële groeifase duurde bij de groei op het opgeloste substraat korter
De oppervlakte en scheidingsvlakspanningen van de gehele kweek waren tijdens de groei op citraat vrij konstant, tijdens de groei op hexadekaan nam dit bij 10-14 uur af. Dit komt overeen met de verhuizingsperiode van de cellen van het niet-opgeloste hexadekaan naar det opgeloste hexadekaan als substraat, zie figuur 3.

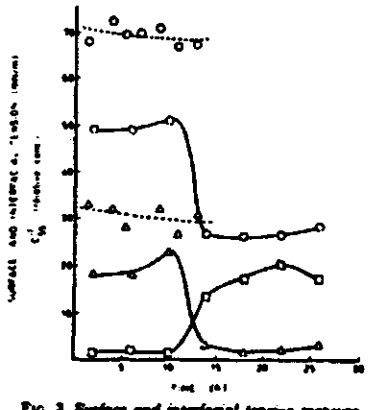


FIG. 3. *Surface and interfacial tension measurements and relative surfactant concentration of whole microbial broth during growth on hexadecane (——) and sodium citrate (·····). Symbols: O, surface tension of whole broth; Δ, interfacial tension between hexadecane and whole broth; □, relative surfactant concentration C_m^{-1}, relative units.*

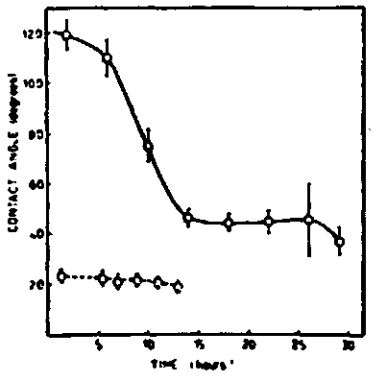


FIG. 4. *Contact angle of cell free broth on cells in hexadecane. Bars represent one standard deviation from the mean. Each value represents the mean of 10 measurements. Measurements on cells originating from the hexadecane fermentation (——); angles on cells originating from the sodium citrate fermentation (·····).*

De cellen blijken waterminnend te zijn tijdens groei op opgeloste substraten en olieminnend tijdens groei op niet-opgeloste koolwaterstoffen.

Uit dit onderzoek blijkt, dat er ook bakteriën zijn die niet-opgeloste koolwaterstoffen direkt op kunnen nemen. Het celoppervlak wordt dan olieminnend. Dit wijst op het ontstaan van lipofiele celwandgebonden verbindingen en dit zouden 'speciale receptoren' kunnen zijn voor de opname van koolwaterstof. Er is geen informatie gevonden over de specificiteit van deze 'speciale receptoren'. Het is gebleken, dat bij Acinetobacter de maximale specifieke groeisnelheid op het onopgeloste koolwaterstof hoger is dan op de opgeloste koolwaterstof.

Roy et al. (1979) beschreven het emulgerend en oplossend vermogen van celvrije media van de gist Endomycopsis na groei op koolwaterstoffen. Het emulgerend vermogen werd gemeten m.b.v. extinktiemetingen, het oplossend vermogen werd gemeten door het heptaanextrakt van in celvrije media opgeloste koolwaterstoffen te analyseren m.b.v. CLC. De groei van de gist werd gemeten door weging van de droge biomassa. In figuur 5. is te zien, dat het emulgerend vermogen - bepaald voor extinktiemetingen bij 610 nm - van celvrij medium voor dodekaan groter is na groei op dodekaan dan na groei op glukose, acetaat of palmiaat.

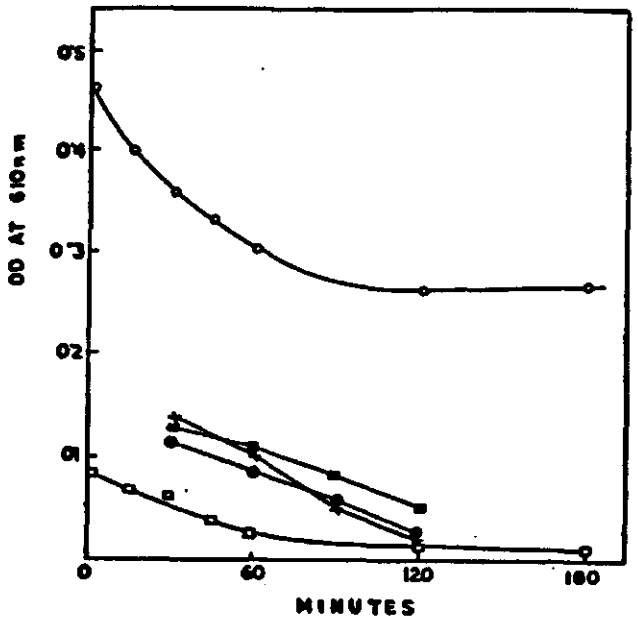


Fig. 5. Stability of *n*-dodecane emulsion in cell-free culture medium obtained from aerobic cultivation of *E. lipolytica* Y-13 on *n*-dodecane and other nonhydrocarbon substrates for 24 hr. (○–○) Normal dodecane; (•) glucose; (⊘) acetate; (▲) palmitate; (□) control, noncultured.

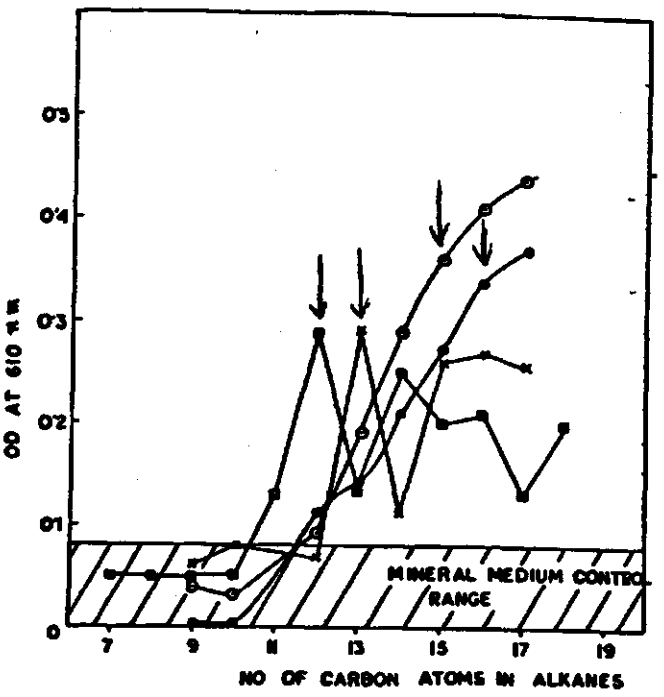


Fig. 6. Comparative emulsification of various *n*-alkanes by cell-free culture medium obtained from cultivation of the yeast on different *n*-alkanes. (□) Growth on *n*-dodecane, C_{12}; (•) growth on *n*-tridecane, C_{13}; (○) growth on *n*-pentadecane, C_{15}; (⊘) growth on *n*-hexadecane, C_{16}.

In figuur 6. is de specificiteit van het emulgerend vermogen weergegeven na groei op een viertal n-alkanen. Het emulgerend vermogen blijkt niet erg specifiek te zijn. In het algemeen is het voor kortere ketens geen geschikte emulgator, voor langere ketens kan het beter werkzaam zijn, bij even en oneven ketenlengten kan het emulgerend vermogen specifieker zijn.

Het oplossend vermogen nam toe gedurende de opbouw van de populatie, maar nam af toen de opbouw afnam. In tabel 1. is de maximale oplosbaarheid van een aantal alkanen in de celvrije media opgenomen, en de 'normale' oplosbaarheid in water.

TABLE I
Solubilization of Hydrocarbons during Growth of *E. lipolytica* Y-13

Growth substrate	Maximum solubility during growth (g/liter)[a]	Normal aqueous solubility[a,18] (g/liter)[b]	Increase in solubility (x times)
n-Decane	0.5	5.2×10^{-5}	1×10^{4}
n-Dodecane	0.6	8×10^{-6}	7.5×10^{4}
n-Tridecane	0.56	8×10^{-6}	7.0×10^{4}
n-Tetradecane	0.35	7×10^{-6}	5×10^{4}
n-Pentadecane	0.6	6×10^{-6}	1×10^{5}
n-Hexadecane	0.4	6×10^{-6}	6.6×10^{4}
n-Heptadecane	0.8	6×10^{-6}	1.3×10^{5}
n-Octadecane	0.6	6×10^{-6}	1.0×10^{5}
n-Nonadecane	0.5	6×10^{-6}	8.3×10^{4}
Hexadecene-1	1.1		
Octadecene-1	1.1		
Glucose	nil[b]		

[a] Solubility of the hydrocarbon used as growth substrate.
[b] Solubility of *n*-dodecane.

Het emulgerend vermogen van de celvrije media ging verloren na toevoeging van een protease, zowel het oplossend als het emulgerend vermogen gingen vrijwel geheel verloren na toevoeging van EDTA, een reagens dat metaalionen onttrekt.
Uit dit onderzoek blijkt, dat Endomycopsis extracellulaire verbindingen produceert, die het emulgeren en oplossen van alkanen in water stimuleren. Het emulgerend vermogen van het celvrije medium is vrij stabiel en niet temperatuurgevoelig, maar verdwijnt door toevoeging van EDTA. Het oplossend vermogen van het celvrije medium is zeer instabiel en verdwijnt snel na toevoeging van proteasen of EDTA. Het oplossend vermogen is zeer substraatspecifiek, het emulgerend vermogen in minder substraatspecifiek.

Reddy et al. (1982) gebruikten EDTA en proteasen om de extracellulaire verbindingen in hun werking te verstoren en zo hun invloed op de groeisnelheid van de mikro-organismen te meten. EDTA remde de groei van de gisten Endomycopsis en Candida en de bakterie Pseudomonas op hexadekaan sterk (zie figuur 7.), de remming werd opgeheven door toevoeging van 'surfactants' of Ca^{2+}. EDTA had geen invloed op de groei op acetaat, bouillon of pentaan, een gasvormige koolwaterstof, en op de adsorptie van de cellen aan alkaandruppeltjes.

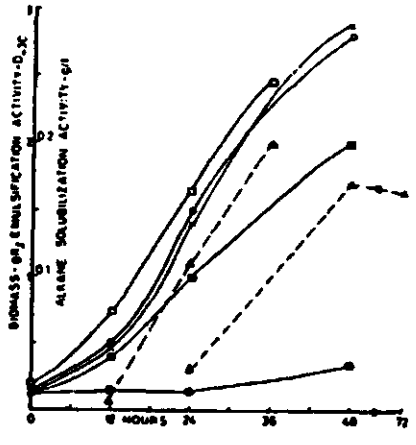


Fig. 1. Effect of EDTA on growth of *Pseudomonas* PG-1 on *n*-hexadecane. Unemulsified alkane: growth—(●) control, (○) 2.5m*M* EDTA, (▲) 2.5m*M* EDTA + 1.3m*M* Ca^{2+}. Emulsified alkane: growth—(■) control, (□) 2.5m*M* EDTA. (▲ ▲) *n*-Hexadecane emulsification activity during growth on unemulsified alkane; (△ △) *n*-hexadecane solubilization activity during growth on unemulsified alkane.

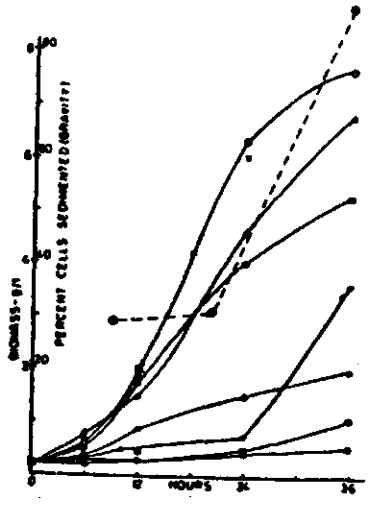


Fig. 2. Effect of EDTA on growth of *E. dipodavus* YM on *n*-hexadecane. Unemulsified alkane: growth (●) control, (▲) 2.0m*M* EDTA, (■) 3.0m*M* EDTA, (○) 4.0m*M* EDTA; (▲) 2.5m*M* EDTA + 1.3m*M* Ca^{2+}, (▽) 4.0m*M* EDTA + 2.9m*M* Mg^{2+}. Emulsified alkane: growth—(▽) control, (□) 4.0m*M* EDTA, (▽ ▽) Percent cells sedimented (gravity separation), control growth on unemulsified alkane.

EDTA bleek het oplossend vermogen te verstoren, en remde de groei op alkaandruppeltjes, maar niet de groei op opgeloste alkanen. Proteasen verstoorden het emulgerend vermogen. (zie tabel 3.)

Effect of EDTA and Proteolytic Enzymes on Alkane Solubilization and Emulsification by Cell-Free Culture Medium Obtained after Cultivation of *Pseudomonas* PG-1 on *n*-Tetradecane for 48 h

Conditions	*n*-Tetradecane solubility (mg l.)	*n*-Tetradecane emulsification D_{420}
control, no additions	24.0	0.56
+ 4mM EDTA	5.4	0.54
+ 4mM EDTA + 0.08 mM Ca^{2+}	20.4	0.55
+ chymotrypsin (1500 units/mL)	16.2	0.04
+ Protin AS-20 (1500 units/mL)	N.D.[a]	0.0n
adjusted to pH 2.5	2.5	N.D.[a]

[a] N.D.—not done.

Tabel 3.

De olieminnendheid van de cellen was sterk afhankelijk van de mate van koolwaterstofemulgatie, en was onafhankelijk van de groeisnelheid van de mikro-organismen op de koolwaterstof, zie tabel 2.

Comparative Characteristics of the Microbial Strains Used.

Organism	Growth on *n*-hexadecane	Affinity to oil phase	Alkane emulsification during growth	Hydrocarbon solubilization during growth
Eukaryotes				
E. lipolytica Y-13 (micromorganisms)	good growth μ = 0.13-0.20 h^{-1} (shake flask)	high affinity to oil phase—70-90% cells adsorbed on oil phase (gravity); high resistance to separation by centrifugal force	good emulsification[a]	specific alkane and alkene solubilization[a]
E. lipolytica YM (microorganisms)	exceptionally good growth μ = 0.25-0.62 h^{-1} (shake flask)	poor affinity to oil phase—40-70% cells adsorbed on oil phase (gravity); cells easily separated from oil phase by low centrifugal force	no emulsification observed	not done
C. tropicalis RAY-14 (microorganisms)	average growth μ = 0.08-0.15 h^{-1} (shake flask)	poor affinity to oil phase—65% cells adsorbed on oil phase (gravity); cells easily separated by moderate centrifugal force	not done	not done
Prokaryotes				
Pseudomonas sp. PG-1	poor growth μ = 0.08-0.10 h^{-1} (shake flask)	very strong affinity to oil phase—more than 90% cells adsorbed on oil phase (gravity); very high resistance to separation by centrifugal force—even at 20,000*g* only 10% separated	very high emulsification	specific hydrocarbon solubilization observed.

Tabel 4.

De specificiteit van de koolwaterstofoplossende faktoren van Pseudomonas is beschreven in tabel 3. Dit zijn de oplosbaarheden in de celvrije media na een inkubatie van 72 uur.

Specificity of Hydrocarbon Solubilization by Cell-Free Culture Medium Obtained from Cultivation of *Pseudomonas* PG-1 on Hydrocarbons for 72 h

Hydrocarbons tested for solubility	Growth substrate solubility[a] (mg/L)					
	n-tetradecane	*n*-octadecane	hexadecene-1	octadecene-1	pristane	dodecyl-benzene
n-undecane	—	—	—	—	—	15.0
n-dodecane	—	—	—	—	—	15.4
n-tridecane	4.0	—	—	—	—	14.0
n-tetradecane	80.5	—	—	—	3.5	—
n-pentadecane	7.6	1.0	trace	—	3.2	—
n-hexadecane	6.9	13.0	—	11.8	trace	—
n-heptadecane	—	31.0	5.0	11.5	—	—
n-octadecane	—	51.0	—	—	—	—
hexadecene-1	—	—	54.8	—	—	—
octadecene-1	—	—	—	39.0	—	—
pristane	—	—	—	—	23.8	—
dodecylbenzene	—	—	—	—	—	36.0

[a] (—) not done.

Tabel 5.

Voor alle onderzochte koolwaterstoffen is het oplossend vermogen van de door Pseudomonas uitgescheiden faktoren het hoogste voor het groeisubstraat. De oplosbaarheden die hier genoemd worden zijn veel lager dan de door Roy et al. (1979) gevonden waarden voor Endomycopsis. Bij Endomycopsis werden maximale oplosbaarheden gegeven, die na 10-14 uur inkubatie werden gemeten, daarna nam het oplossend vermogen af. Evenwel is de maximale specifieke groeisnelheid van Endomycopsis hoger dan die van Pseudomonas (zie tabel 2).
In dit artikel wordt aannemelijk gemaakt, dat zowel schimmels als bakteriën min of meer specifieke verbindingen kunnen uitscheiden, die koolwaterstoffen beter opneembaar kunnen maken. Waarschijnlijk werken beide faktoren samen het beste; de koolwaterstoffen worden eerst geemulgeerd tot zeer kleine 'druppeltjes' en van daaruit oplosbaar in water gemaakt. Bij verstoring van deze faktoren neemt de groeisnelheid sterk af. In dit onderzoek bleek de olieminnendheid van de cellen samen te hangen met het emulgerend vermogen, in tegenstelling tot hetgeen door Neufeld et al. (1980) werd beschreven. Bij Acinetobacter ging het olieminnend karakter van de cellen verloren bij groei op opgeloste koolwaterstoffen. De olieminnendheid van cellen is dus geen maat voor het emulgerend vermogen.

De resultaten van de hier beschreven artikelen betekenen voor landfarming het volgende:

- Stikstofbemesting: Minder dan de helft van de door Austin et al. geïsoleerde bakteriën kon nitraat gebruiken als N-bron. bij landfarming dient er gebruik gemaakt te worden van tevens een andere stikstofbron, bijvoorbeeld ammonium.
- Zuurstof: Het merendeel van de geïsoleerde mikro-organismen breken de koolwaterstoffen aeroob af. Anaerobe omstandigheden zullen op een landfarm vermeden moeten worden, een losse bodemstruktuur van beperkte laagdikte kan dit realiseren.
- Temperatuur: Temperatuur beïnvloedt het aantal soorten mikro-organismen dat bij de afbraak van olie is betrokken. Daarenboven beïnvloedt het de groei-aktiviteit van de mikro-organismen.
- Beweeglijkheid: Het grootste deel van het door Austin et al. geïsoleerde bakteriën waren onbeweeglijk; dat betekent dat verplaatsing van aangepaste mikro-organismen niet aktief plaats vindt.Bij landfarming kan de verplaatsing gebeuren door grondbewerking.
- Toxiciteit: Davies en Westlake (1979) vonden, dat zware ruwe olie niet toxisch is voor schimmels, maar geen van de geïsoleerde schimmels kon erop groeien. Op gewone ruwe olie konden de meeste schimmels wèl groeien. Indien voor bakteriën vergelijkbare resultaten worden gevonden, zou dit kunnen betekenen, dat landfarming voor zware ruwe olie geen geschikte reinigingstechtniek is, tenzij er speciale behandelingen gevonden worden, bijvoorbeeld vermengen van de met zware ruwe olie verontreinigde grond met andere met olie verontreinigde grond, waardoor er mogelijk meer cometabole afbraak van de zware oliekomponenten voor kan komen.
- Opname van koolwaterstoffen: Er zijn een aantal mogelijkheden.
  - = Direkte opname van onopgeloste koolwaterstoffen: veel schimmels kunnen in de onopgeloste koolwaterstoffen binnendringen en daar de koolwaterstoffen direkt opnemen. Bij Acinetobacter, een bakterie, werd er tijdens direkte opname van onopgeloste koolwaterstof een bijna tweemaal zo hoge maximale specificke groeisnelheid gemeten.
  - = Opname van verdampte koolwaterstoffen: zowel schimmels als bakterien kunnen via de luchtfase koolwaterstoffen opnemen.

= Opname van opgeloste koolwaterstoffen: mikro-organismen scheiden min of meer specifieke emulgatoren en zeer specifieke oplossende faktoren uit als reaktie op de aanwezigheid van koolwaterstoffen. Bij verstoring van deze faktoren wordt de groeisnelheid van de mikro-organismen aanzienlijk lager. De oplossende faktoren bleken instabiel, de emulgerende faktoren bleken tamelijk stabiel te zijn en niet temperatuurgevoelig.
Het blijkt, dat mikro-organismen zelf allerlei mechanismen hebben om de oliekomponenten zo goed mogelijk op te kunnen nemen en dus het substraat zo snel mogelijk te gebruiken. De ene doet dat via direkte opname van onopgeloste koolwaterstof, de andere door emulgerende en oplossende faktoren uit te scheiden en vervolgens de opgeloste koolwaterstof op te nemen. Opname van gasvormige koolwaterstof kan in principe zowel direkt als via de waterfase plaatsvinden.
De emulgerende faktoren blijken niet erg specifiek te zijn, en tamelijk stabiel. Dat betekent, dat hun werking ook tijdens voor de groei ongunstiger omstandigheden (bijvoorbeeld een lagere temperatuur) kan blijven voortduren. Indien de mikro-organismen minder snel groeien, en minder snel koolwaterstoffen opnemen, blijven er meer koolwaterstoffen opgelost in het water. Dit geeft het risiko, dat bij regenval opgeloste oliekomponenten uitspoelen naar het grondwater. Aan de andere kant kàn het toevoegen van emulgatoren onder gunstige groeiomstandigheden voor de mikroorganismen misschien een verhoging van de afbraaksnelheid veroorzaken. Maar indien de groeiomstandigheden ongunstiger worden, kan dit leiden tot een sterke verontreiniging van het grondwater.

Samengevat leidt het bovenstaande tot de volgende aanbevelingen voor landfarming:

- bemesting niet alleen met nitraat; lang niet alle olieafbrekende mikro-organismen kunnen nitraat en nitriet reduceren.
- een losse bodemstruktuur van beperkte laagdikte, olieafbraak is vrijwel geheel een aeroob proces.
- een zo hoog mogelijke temperatuur, dat bevordert de groeisnelheid van de mikro-organismen en het aantal aktieve soorten.

- een nader te onderzoeken frequentie van bewerking van de hele grondlaag voor de verspreiding van de merendeels onbeweeglijke aan olieafbraak aangepaste mikro-organismen.
- geen toepassing van emulgatoren, dat doen de mikro-organismen zelf wel.

Faktoren als pH, bodemvochtigheid, elementen als P en K en spore-elementen en aanwezigheid van toxische verbindingen beïnvloeden de groeisnelheid van de mikro-organismen ook. ~~Voor~~ *De* invloed van dergelijke milieufaktoren wordt verwezen naar het review artikel van Atlas (1981) en het collegediktaat mikrobiologie (1983, deel 1).

Literatuurlijst:

1. Beerstecher E. 1954. Petroleum microbiology. New York: Elsevier.
2. ZoBell C.E. 1973. Microbial dagradation of oil: Present status, problems and propectives, pp. 3-16. In Ahearn, D.C., Meyers, S.P. (eds), The microbial degradation of oil pollutants. Baton Rouge, Louisiana;
3. Austin B., Calomiris J.J., Walker J.D. and Colwell R.R. 'Numerical Taxonomy and Ecology of Petroleum-Degrading Bacteria' Appl. Environ. Microbiol 1977; 34: 60-68.
4. Davies J.S. and Westlake W.S. 'Crude-oil utilization by fungi' Can. J. Microbiol. 1979; 25: 146-156.
5. Scott C.C.L. and Finnerty W.R. ' A Comparative Analyses of the Ultrastructure of Hydrocarbon-oxidizing Micro-organisms' J. Gen. Microbiol. 1976; 94: 342-350.
6. Smucker R.A. and Cooney J.J. 'Cytological responses of Cladosporium resinae when shifted from glucose to hydrocarbon medium' Can. J. Microbiol. 1981; 27: 1209-1218.
7. Neufeld R.J., Zajic J.E. and Gerson D.F. 'Cell Surface Measurements in Hydrocarbon and Cardohydrate Fermentations' Appl. Environ. Microbiol. 1980; 39: 511-517.
8. Roy P.K., Singh H.D., Bhagat S.D. and Baruah J.N. 'Characterization of Hydrocarbon Emulsification ans Dolubilization during the Growth of Endomycopsis lipolytica on Hydrocarbons' Biotechn. Bioeng. 1979; 21: 955-974.
9. Reddy P.G., Singh H.D., Roy P.K. and Baruah J.N. 'Predominant Role of Hydrocarbon Solubilization in the Microbial Uptake of Hydrocarbons' Biotechn. Bioeng. 1982; 24: 1241-1269.

4. De effekten van temperatuur en grondbewerking op de afbraak van olie in grond.

4.1. Inleiding

De groeisnelheid van mikro-organismen is sterk afhankelijk van de temperatuur. In optimale laboratoriumomstandigheden heeft een temperatuurverhoging met 10° C tot gevolg, dat de maximale specifieke groeisnelheid wordt verhoogd met een faktor 2 à 3. Bij de afbraak van olie in grond, zal temperatuurverhoging een verhoging van de afbraaksnelheid tot gevolg hebben, maar hoe groot dat effekt is, is nog niet bekend. Daarnaast kan de temperatuur een effekt hebben op de tijdens de afbraak ontstane hoeveelheid afbraakprodukten. In Nederland speelt het ontstaan van afbraakprodukten een grote rol bij landfarming, aangezien hier vrij veel regen valt, en afbraakprodukten tijdens de afvoer van die regen kunnen uitspoelen naar het grondwater.
In dit experiment is onderzocht, welke invloed de temperatuur heeft op de afbraak van olie in grond, en op het ontstaan van afbraakprodukten. Daarnaast is het effekt van grondbewerking onderzocht. Grondbewerking leidt tot een lossere bodemstruktuur, waardoor de toevoer van zuurstof gemakkelijker kan plaatsvinden. Daarnaast zorgt het voor een betere verdeling van de olie en de mikro-organismen in de grond. Zowel grondbewerking als temperatuurverhoging kunnen leiden tot een verhoging van de afbraaksnelheid. In dit onderzoek is nagegaan, hoe groot het effekt is, mede in relatie met het ontstaan van afbraakprodukten.

4.2. Materiaal en methoden.

In dit experiment is gebruik gemaakt van de reeds eerder beschreven met ruwe en gasolie verontreinigde grond uit Wijster. Van beide gronden is met een Edelmanboor een mengmonster van 20 aselekt gestoken monsters per proefveld gemaakt. De met ruwe olie verontreinigde grond was venig van struktuur en rook sterk naar olie, de met gasolie (HBO) verontreinigde grond was zandig en rook minder sterk. De mengmonsters zijn binnen een week verwerkt en gedurende die periode bewaard bij kamertemperatuur.

De grond is gezeefd met een 1 cm zeef om stenen en andere niet-grond deeltjes te verwijderen. De beide gronden zijn bemest met 250 ppm $N\text{-}NH_4NO_3$ en 50 ppm $P\text{-}KH_2PO_4:K_2HPO_4=1:2$, gebaseerd op de gegevens over de oliekonsentraties bij aanvang van het experiment. Voor een onderbouwing van deze mestgift wordt verwezen naar het verslag van A.E. Boekhold, die tegelijkertijd met dezelfde grond een experiment deed met diverse mestgiftkonsentraties.

De pH van de crude-grond was bij aanvang 6,9; die van de HBO-grond 5,4. De HBO-grond is bekalkt met $CaCO_3$ tot een pH van $\pm$7,0; tevens is deze grond bevochtigd met $\pm$10 % water. Het drooggewicht van de crude grond was bij aanvang 83 % van het natgewicht; bij de HBO was dit 83.%.

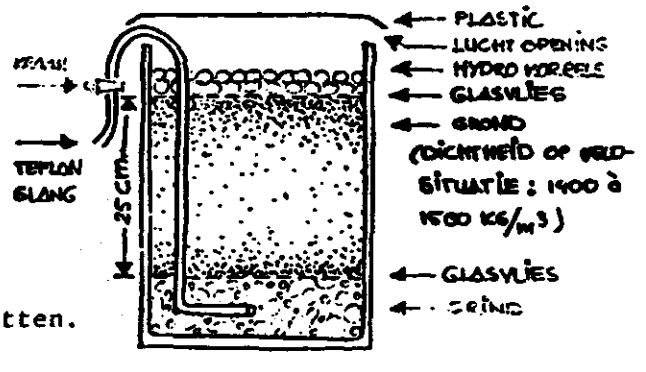
Er is gebruik gemaakt van 3L weckpotten, waarin 2,5 kg grond werd gebracht. De potten waren als volgt ingericht, zie figuur 1.

Onderin was een laagje van ca. 3 cm aquariumgrind (ø $\pm$ 3 mm), dat werd afgedekt met een glasvlies. Bovenop het glasvlies werd 2,5 kg grond gebracht met een dichtheid op veldkapaciteit. Daarboven was weer glasvlies en een laagje van $\pm$ 5 cm hydrokorrels (uit de plantenwinkel met een ø van $\pm$ 1,2 cm) vanwege de vochthuishouding. Vanuit de grindlaag liep een teflon buisje (ø 3 mm) door de grond naar boven en buiten de pot werd dit afgesloten met een slangklem. De pot werd afgedekt met dik plastic ter voorkoming van vochtverlies; in de experimenteerruimte was een sterke luchtcirculatie en er heerste een temperatuur van 20° C. Per vervuilde grond werden er 5 potten ingericht, zie figuur 1.

Bij 20° C waren er 3 potten, waarvan er 1 regelmatig werd bewerkt door de grond met een lepel uit de pot te scheppen en daarna weer terug te doen.

Bij 30° C, hetgeen bereikt werd m.b.v. een waterbad met thermostaat stond 1 pot

Bij 10° C, in een koelkast met thermostaat, stond tevens 1 pot per verontreiniging.



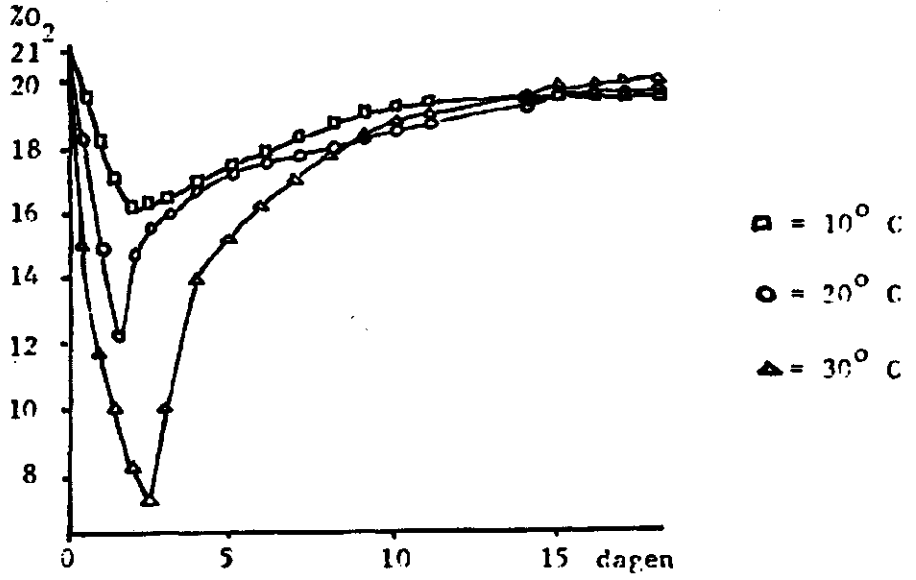
Figuur 1. Inrichting van de potten.

Indien de bodem voldoende poreus is, is het zuurstofgehalte onderin de potten een indikatie voor de aktiviteit van de mikro-organismen. De mikro-organismen gebruiken zuurstof voor de afbraak van oliekomponenten, maar de diffusie van zuurstof in de grond voert nieuwe aan. Indien er hoge zuurstofkonsentratie worden gemeten (21 %), dan zijn de mikro-organismen niet erg aktief; naarmate er een lagere zuurstofkonsentratie wordt gemeten, zijn de mikro-organismen aktiever. Uit onderzoek van Bauer en Capone (1985) is gebleken, dat mikro-organismen bij zuurstofkonsentraties vanaf 2,5 % oliekomponenten kunnen mineraliseren. In dit experiment is de laagst gemeten zuurstofkonsentratie onder in de potten ± 8 %.

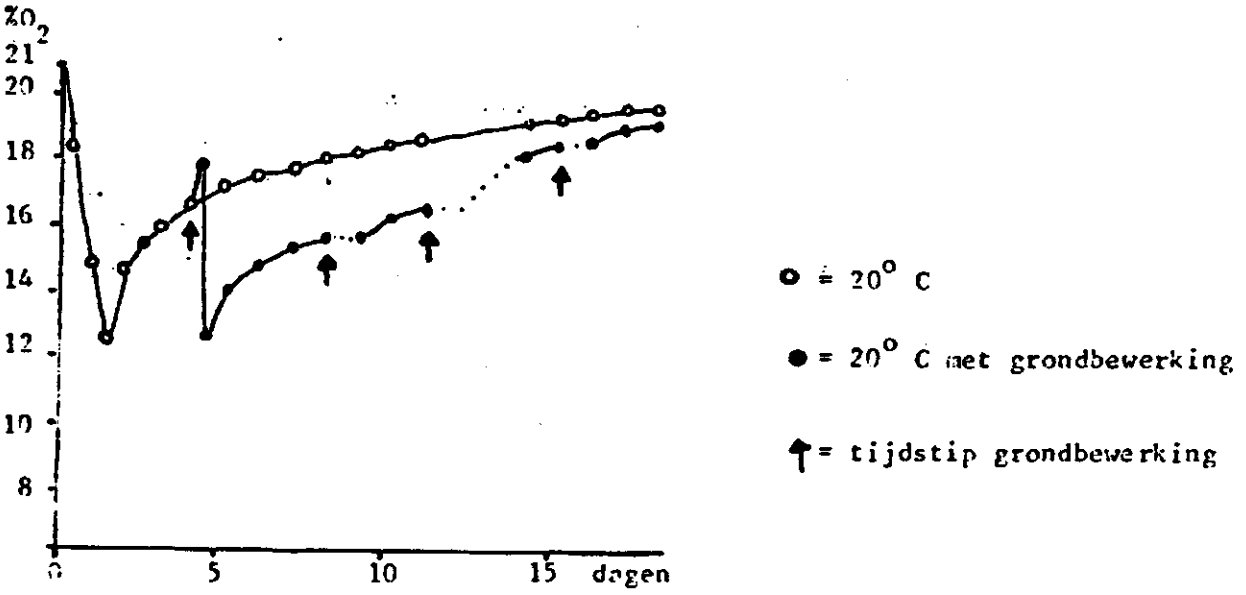
Het zuurstofgehalte onderin de pot is gemeten door het teflon buisje aan te sluiten op een zuurstofmeter. Er werd 35 ml lucht m.b.v. een zuiger door de meter gezogen en in de laatste ml's werd de zuurstofkonsentratie bepaald. Kontrôles wezen uit, dat 35 ml de minimale hoeveelheid lucht was voor betrouwbare analyses.
Na afloop van het experiment zijn de volgende bepalingen uitgevoerd:
- olieanalyse m.b.v. hexaanextraktie/GC
- Total Organic Carbon
- ammonium
- nitraat
- fosfaat
- pH

4.3. Resultaten

Voor de crude-grond zijn de zuurstofgehalten onder in de potten weergegeven in de figuren 2. (temperatuur) en 3. (grondbewerking). Bij 10 en 20° C wordt de laagste zuurstofkonsentratie bereikt tijdens de tweede dag, bij 30° C tijdens de derde. Naarmate de temperatuur hoger is, wordt er een lagere zuurstofkonsentratie in de grond gemeten, maar het verschil tussen 20° en 10° C is na 3 dagen niet groot meer. Het effekt van de temperatuur is na 2 weken vrijwel verdwenen.
Na de eerste grondbewerking is het verloop in de zuurstofkonsentratie onderin de pot met korte tussenpozen gemeten, vandaar de scherpe pieken in de figuren 3 en 5 na de eerste grondbewerking.



Figuur 2. Effekt van temperatuur op de zuurstofkonsentratie onderin de pot. (CRUDE)



Figuur 3. Effekt van grondbewerking op de zuurstofkonsentratie onderin de pot. (CRUDE)

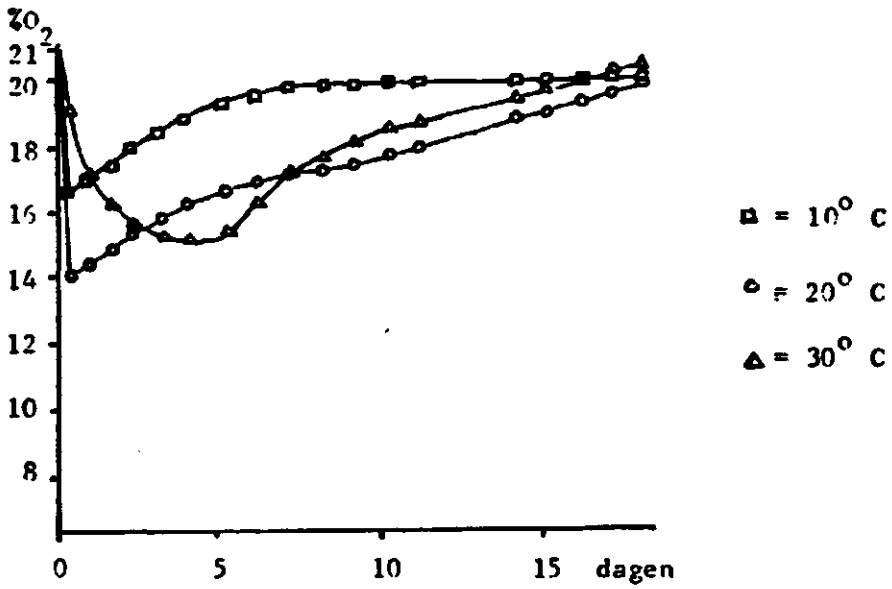
Uit de olie-analyses blijkt (zie tabel 4.1.), dat bij de hoogste temperatuur en bij grondbewerking de meeste olie is verdwenen, èn de laagste TOC-waarden worden gevonden. Bij de laagste temperatuur is de minste olie verdwenen en wordt de hoogste TOC-waarde gemeten. Bij de lagere temperaturen blijft er iets meer nitraat-N en ammonium-N over. Vrije fosfaten zijn in alle potten verdwenen. De pH is na afloop van het experiment iets lager.

Tabel 4.1. Resultaten van de analyses, Crude-oil.

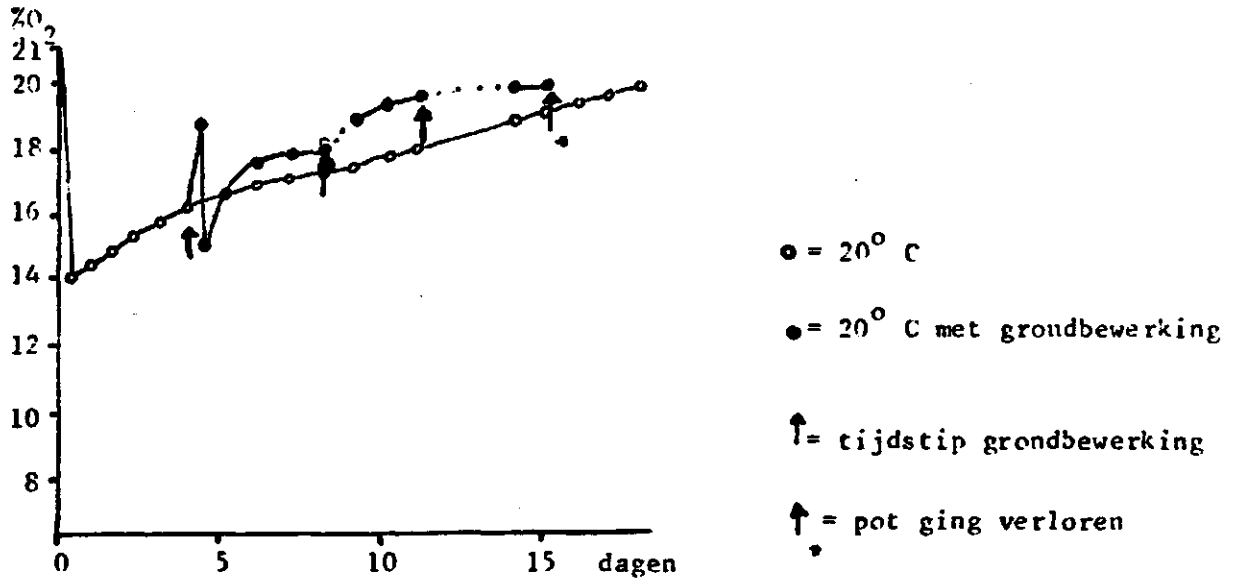
	olie	TOC (water)	NH_4	NO_3	PO_4	pH
	mg/kg	mg C/kg	mg N/kg	mg N/kg	mg P/kg	
begin	7800	115	+125	+125	+150	6,9
na 28 dagen:						
10° C	3900	152	9,3	61	0	6,7
20° C	2100	98	6,9	50	0	6,7
20° C	2000	100	6,8	49	0	6,8
20° C[1)]	400	85	6,2	39	0	6,8
30° C	400	83	6,5	38	0	6,8

1)= met grondbewerking. + staat voor: toegevoegd.

Voor de HBO-grond zijn de zuurstofgehalten onderin de potten weergegeven in de figuren 4. (temperatuur) en 5. (grondbewerking).
Bij 10 en 20° C wordt de laagste zuurstofkonsentratie bereikt na 0,5 dag, bij 30° C gedurende de vierde dag. De tijd dat er een lage zuurstofkonsentratie is onderin de pot is bij 30° C het langste. Bij 10° C is het snelst een hoge (19,5 %) bereikt. Het effekt van grondbewerking is, dat de zuurstofkonsentratie onderin de pot toeneemt.



Figuur 4. Effekt van temperatuur op de zuurstofkonsentratie onderin de pot. (HBO)



Figuur 5. Effekt van grondbewerking op de zuurstofkonsentratie onderin de pot. (HBO)

Uit de olie-analyses blijkt (zie tabel 4.2.), dat bij 20 en 30° C veel meer olie is afgebroken dan bij 10° C. Het verschil in olie-afbraak tussen 20 en 30° C is niet groot. De TOC-waarden zijn bij 10° C het hoogst en bij 30° C het laagst. Bij lagere temperaturen blijven er iets meer nitraat-N en ammonium-N over. Vrije fosfaten zijn in alle potten verdwenen.

Tabel 4.2. Resultaten van de analyses, HBO.

	olie	TOC	NH_4	NO_3	PO_4	pH
	mg/kg	mg C/kg	mg N/kg	mg N/kg	mg P/kg	
begin	1800	125	+125	+125	+150	7,1
na 28 dagen:						
10° C	1000	190	10,4	398	0	7,4
20° C	500	177	5,2	375	0	7,5
20° C	400	175	5,9	369	0	7,4
30° C	300	103	5,0	371	0	7,7

20° C met grondbewerking is verloren gegaan. + staat voor: toegevoegd.

4.4. Konklusies en diskussie

Het meten van de zuurstofkonsentraties onderin de potten heeft als voordeel, dat de effekten van de diverse bewerkingen op de zuurstofkonsentratie extrapoleerbaar zijn naar de veldsituatie, maar als nadeel, dat het afbraakproces niet door het zuurstofverbruik te volgen is. Pogingen om bij de diverse temperaturen het zuurstofverbruik te meten mislukten vanwege verstoppingen in de luchtuitvoer door kondenswater bij 30° C en een geschikte regeling van de toevoer werd niet bereikt.

Voor de zuurstofkonsentraties in de potten geldt, dat de diffusie bij hogere temperaturen sterker is. In de wet van Fick: $F=-D.dc/dx$, die de diffusie over een bepaalde afstand beschrijft is D immers temperatuurafhankelijk. Daarom zijn de verschillen in zuurstofkonsumpties bij de diverse temperaturen groter dan uit de grafieken voor de zuurstofkonsentraties blijkt.

Indien er een eerste-orde-kinetiek wordt aangenomen voor de afbraak van olie, kan m.b.v. de gegevens van het oliegehalte een halfwaardetijd bij de diverse temperaturen en grondbewerking worden berekend voor de beide olie's. Nulde-orde-kinetiek vindt plaats bij een konstante afname van de oliekonsentratie.

Eerste-orde-kinetiek: $dc/dt = -kc$ (k=afbraakkonstante)

$dc/c = -k.dt$

$\ln c = -kt + \text{konstante}$

Indien t=0 dan $c=c_o$: $\ln c = -kt + \ln c_o$

$\ln (c/c_o) = -kt$

$c/c_o = e^{-kt}$

$c = c_o . e^{-kt}$

Nulde-orde-kinetiek: $c_t = c_o - k'.t$ (≥ 0), (k'=afbraaksnelheid)

t= 28 dagen

Voor de crude-oil geldt dan:

	Eerste-orde-kinetiek ($t_{\frac{1}{2}}$)	Nulde-orde-kinetiek (k')
10° C	28,0 dagen	139 mg/kg.dag
20° C	14,8 dagen	204 mg/kg.dag
20° C [1)]	7,1 dagen	260 mg/kg.dag
30° C	6,5 dagen	264 mg/kg.dag

Door A.E. Boekhold is een literatuuronderzoek uitgevoerd naar landfarming. In haar verslag staan de in deze literatuur gevonden halfwaardtijden en afbraaksnelheden voor de afbraak van olie bij diverse beginkonsentraties vermeld. Ook zijn door haar met dezelfde grond potexperimenten uitgevoerd, waarbij lucht door de grond werd geleid. Zij vond afbraaksnelheden die iets hoger liggen dan de door mij gevonden waarden, maar die redelijk overeenkomen met de in de literatuur gevonden waarden voor nulde-orde-kinetiek. Een nulde-orde-kinetiek lijkt derhalve een geoorloofde aanname voor de afbraak van crude-oil in deze grond. De waarden die A.E. Boekhold vond voor de afbraaksnelheid zijn iets hoger dan de door mij gevonden waarden. Dit kan verklaard worden uit de hogere gemiddelde zuurstofkonsentraties in de bodemlucht als gevolg van het doorleiden met lucht. Door de hogere zuurstofkonsentraties kan de afbraak van de olie in de grond sneller verlopen.

De temperatuur blijkt de afbraaksnelheid aanzienlijk te beïnvloeden. Bij 20° C is de afbraaksnelheid bijna 47 % hoger dan bij 10° C; bij 30° C bijna 23 % hoger dan bij 20° C. Het effekt is bij lagere temperatuur dus groter dan bij hogere temperatuur
Ook door grondbewerking wordt de afbraaksnelheid hoger, en wel bijna 28 %. Door een temperatuurverhoging van 10° C naar 20° C gekombineerd met grondbewerking blijkt de afbraaksnelheid ongeveer 90 % groter.

Voor de HBO geldt:

	Eerste-orde-kinetiek ($t_{\frac{1}{2}}$)	Nulde-orde-kinetiek (k')
10° C	33,0 dagen	29 mg/kg.dag
20° C	15,2 dagen	46 mg/kg.dag
30° C	10,8 dagen	54 mg/kg.dag

Ook met deze verontreinigde grond zijn door A.E. Boekhold experimenten uitgevoerd met doorleiding van lucht. De hier vermelde halfwaardetijden zijn iets hoger dan de door haar gevonden halfwaardetijden, hetgeen verklaard kan worden uit de hogere zuurstofkonsentraties in de bodemlucht als gevolg van het doorleiden met lucht. De in de literatuur gevonden waarden zijn hoger dan de door ons gevonden waarden. Dit verschil kan worden verklaard door de veel lagere beginkonsentraties olie in de grond bij het hier beschreven experiment (1800 mg/kg) dan bij de in de literatuur beschreven experimenten (vanaf 5000 mg/kg).

Ook bij de HBO-grond blijkt de temperatuur van grote invloed. Bij 20° C is de halfwaardetijd 54 % lager dan bij 10° C; bij 30° C is de halfwaardetijd 29 % lager dan bij 20° C. Ook hier is het effekt bij lagere temperatuur groter dan bij hogere temperatuur.
Het effekt van grondbewerking op de halfwaardetijd is niet bekend, maar gezien de effekten ervan op de zuurstofkonsentraties onderin de pot kan het effekt niet groot zijn. Dat de zuurstofkonsentraties onder in de pot als gevolg van grondbewerking hoger worden wijst erop, dat grondbewerking de zuurstofkonsentratie wel verhoogt, maar de afbraak niet voldoende versnelt. Dit kan verklaard worden door substraatgebrek. Dat temperatuurverhoging wel effekt heeft, kan verklaard worden door de bij hogere temperatuur optredende verhoogde beweeglijkheid van mikro-organismen met de bij hogere temperatuur voorkomende hogere diffusiesnelheden. Hierdoor wordt de ontmoetingskans tussen mikro-organisme en substraatmolekuul groter.

Uit de resultaten van de analyses van afbraakprodukten blijkt, dat er bij 10° C meer wateroplosbare afbraakprodukten ontstaan dan bij 20° C, en bij 20° C meer dan bij 30° C.
Bij de crude-grond ontstaan er bij 20° C met grondbewerking minder wateroplosbare afbraakprodukten dan zonder grondbewerking bij 20° C.
Ook bij het onderzoek van A.E. Boekhold met dezelfde gronden is gebleken, dat er tijdens experimenten bij de hoogste afbraaksnelheden de minste wateroplosbare afbraakprodukten ontstaan. Het lijkt derhalve geoorloofd te konkluderen, dat er bij de hoogste afbraaksnelheden en de laagste halfwaardetijden de minste wateroplosbare afbraakprodukten ontstaan. Dit betekent voor de praktijk van de landfarm, dat zo optimaal mogelijke afbraakkondities niet alleen ekonomisch aantrekkelijker zijn, maar er onder die omstandigheden tevens zo min mogelijk risiko's zijn voor het grondwater.

5. Het effekt van mengen op de olieafbraak.

5.1. Inleiding

Bij de VAM te Wijster wordt de grond van de diverse olieverontreinigde gebieden niet-gemengd opgeslagen. In een sapromat is onderzocht of afbraak van olie in de grond gestimuleerd kan worden door mengen van twee met olie verontreinigde gronden. De makkelijker afbreekbare komponenten kunnen de mikrobiologische populatie vergroten, en zo invloed kunnen hebben op de - cometabole - afbraak van de moeilijker afbreekbare komponenten. Voorwaarde voor mengen is dan, dat de ene olie moeilijker afbreekbare komponenten bevat (bijv. crude oil) en de andere makkelijker afbreekbare komponenten (bijv. HBO).
Daarnaast kan mengen van twee gronden de bodemstruktuur verbeteren, waardoor toevoer van lucht beter plaats zou kunnen vinden. Ook kunnen eventueel aanwezige remmende faktoren worden verdund.

5.2. Materiaal en methoden

Het experiment is uitgevoerd in een sapromat (zie bijlage 4.) bij 20° C met 100 g grond per vaatje gedurende 28 dagen. De verhoudingen crude-oil grond en HBO grond waren als volgt:

1. 100 % crude
2. 75 % crude + 25 % HBO
3. 50 % crude + 50 % HBO
4. 25 % crude + 75 % HBO
5. 10 % crude + 90 % HBO
6. 100 % HBO

Voor het mengen werd de HBO-grond bekalkt met $CaCO_3$ tot pH = $\pm$ 7 en werd er water toegevoegd. Na bevochtiging was het drooggewicht van de HBO-grond 83 % van het natgewicht, bij de crude was dat 82 %. De crude grond had een pH van 6,9; na mengen van de grond bleek in alle vaatjes de pH 7 te zijn.
De grond in de vaatjes is bemest met 71,43 mg NH_4NO_3; 8,12 mg KH_2PO_4 en 20,76 mg K_2HPO_4. Dit is per grondeenheid dezelfde mestgift als bij de potproeven.

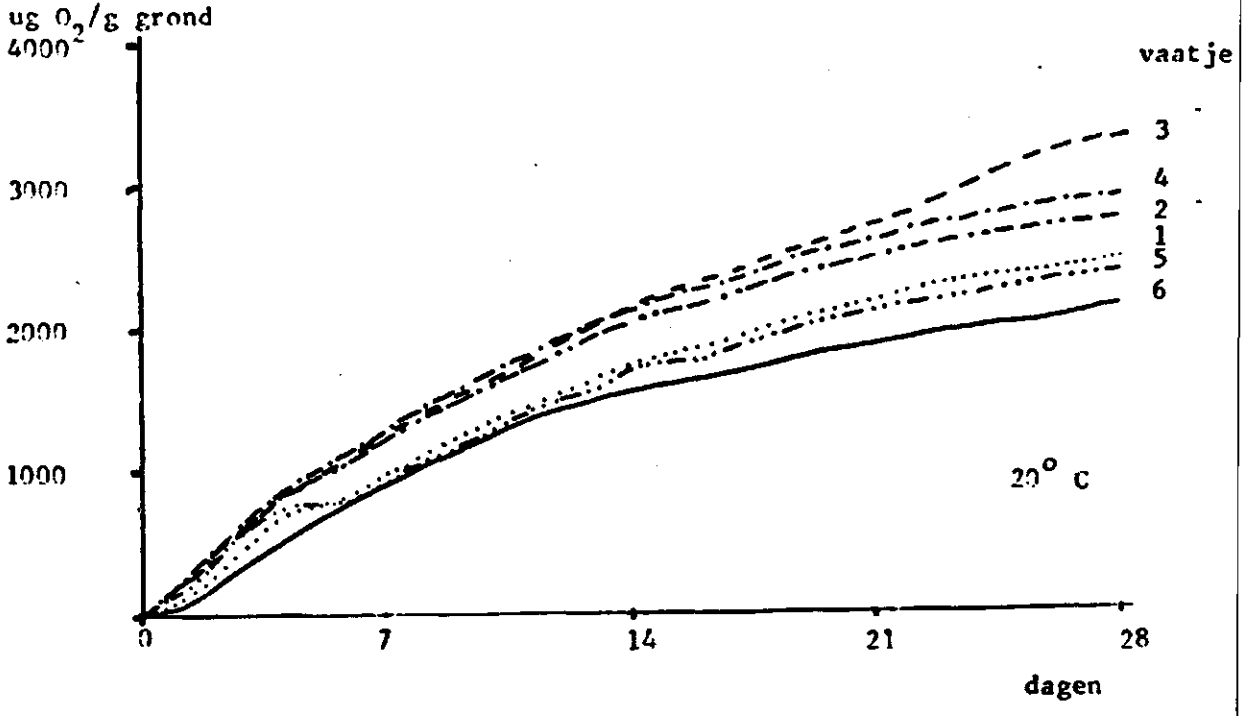
Na het mengen van de grond met de meststoffen is de sapromat aangesloten. In de grond zijn de volgende analyses uitgevoerd:

- olieanalyse m.b.v. gaschromatografie
- TOC
- ammonium
- nitraat
- fosfaat
- pH

De analysemethoden zijn opgenomen in bijlage 3 .

5.3. Resultaten

De resultaten van de zuurstofmetingen van de sapromat zijn weergegeven in figuur 6.



Figuur 6. De invloed van mengverhouding van crude- en HBO-grond op de zuurstofkonsumptie, gemeten m.b.v. een sapromat.

De hoogste zuurstofkonsumptie komt voor bij een mengverhouding van 1:1, (vaatje 3). In tabel 5.1. en 5.2. zijn de resultaten van de uitgevoerde analyses opgenomen.

Tabel 5.2. Resultaten analyses in de waterextrakten van de grond uit de vaatjes bij mengen van crude- en HBO-grond in de sapromat (per 100 g grond)

TOC (ppm C)	t=0	1	2	3	4	5	6
TOC (ppm C)	t=0	120	120	122	122	124	125
	t=28 dagen	94	95	95	96	98	103
NH_4-N (mg)	t=0[f]	+12	+12	+12	+12	+12	+12
	t=28 dagen	0,7	0,6	0,4	0,5	0,5	0,5
NO_3-N (mg)	t=0[f]	+12	+12	+12	+12	+12	+12
	t=28 dagen	5	10	14	27	34	36
PO_4-P (mg)	t=0[f]	+15	+15	+15	+15	+15	+15
	t=28 dagen	0	0	0	0	0	0
pH	t=0	6,9	6,9	7,0	7,0	7,1	7,1
	t=28 dagen	6,8	6,9	7,1	7,2	7,4	7,5

[f]= in de tabel zijn de aan de vaatjes toegediende hoeveelheden vermeld.

5.4. Diskussie en konklusies

De resultaten van dit experiment wijzen uit, dat mengen van twee met olie verontreinigde gronden van verschillende oorsprong een gunstig effekt kan hebben op de afbraak van olie in die grond. Theoretisch is er voor de afbraak van 1 mg olie tot CO_2 en H_2O - uitgaande van hexadecaan als voornaamste komponent - 3,4 mg zuurstof nodig.
(1 mol $C_{16}H_{34}$ + 24,5 mol O_2 ⟶ 1 mol CO_2 + 0,5 mol H_2O)
(1 mol hexadecaan weegt 226 g; 24,5 mol O_2 weegt 784 g)
(voor 1 mg hexadecaan is bij totale verbranding nodig 784/226=3,4 mg O_2)
In table 5.3. zijn de gemeten en theoretische waarden naast elkaar gezet.
Uit deze tabel blijkt, dat er in vaatje 3 6 % minder zuurstof verbruikt is voor de afbraak van 1 mg van de gemengde olie dan op basis van de metingen in de vaatjes 1 en 6 kon worden verwacht. Worden daarbij de TOC-waarden betrokken, die immers in vaatje 3 ook het laagst zijn, dan wijzen de resultaten erop, dat er in vaatje 3 meer celmateriaal is ontstaan uit de olie dan in de andere vaatjes, en dit verklaart dan de hogere totale zuurstofkonsumptie.

Tabel 5.1. Resultaten olie-analyses en zuurstofverbruik per 100 g grond bij mengen van crude- en HBO-grond in de sapromat.

vaatje		1	2	3	4	5	6	
mg olie per vaatje								
t=0	crude	620	465	310	155	62	0	(mg olie)
	HBO	0	45	90	135	162	180	(mg olie)
	totaal (t_0)	620	510	400	290	224	180	(mg olie)
t=28d	totaal (t_{28})	320	230	70	40	50	30	(mg olie)
verschil (t_0-t_{28})		270	280	330	250	174	150	(mg olie)
mg zuurstof na 28 dagen								
verbruikt (b)		250	280	330	295	240	215	(mg O_2)
verwacht$^{\$}$ (w)		250	241	233	224	219	215	(mg O_2)
verschil (b-w)		0	39	97	71	21	0	(mg O_2)
% (w=100 %)		0	16	42	32	10	0	(%)

$^{\$}$= uitgaande van de zuurstofmetingen in de vaatjes 1 en 6 met ongemengde olie-grond.

De olieconsentraties in de met crude-oil en HBO verontreinigde gronden verschilden sterk. Bij meer HBO-grond is minder olie aanwezig per vaatje; er kan dan ook minder olie worden afgebroken. In vaatje 3 is de meeste olie afgebroken, nl. 330 mg/ 100 g grond, en daar is tevens de hoogste zuurstofkonsentratie gemeten.

De overige analyses van de grond uit de sapromatvaatjes na de afbraak zijn opgenomen in tabel 5.2.
De TOC-waarde is in vaatje 3 lager dan het gemiddelde van beide niet-gemengde vaatjes. Vrije fosfaten waren in alle vaatjes verdwenen na 28 dagen, maar er is geen gebrek geweest aan ammonium of nitraat. Naarmate er meer HBO-grond in de vaatjes aanwezig was, en dus meer crude-grond, was de pH na afloop van het experiment hoger.

Tabel 5.3. Vergelijking van het theoretisch mogelijke zuurstofverbruik met de in werkelijkheid gemeten waarden.

		1	2	3	4	5	6	
	afgebroken olie	270	280	330	250	174	150	(mg)
(t)	theoretisch mogelijk O_2-verbruik	918	952	1122	850	592	510	(mg)
(m)	gemeten O_2-verbruik	250	280	330	295	240	215	(mg)
(x)	verbruikt i.v.m. theoretisch (m = (x) % van t)	27	29	29	35	41	42	(%)
(y)	verwacht[f] i.v.m. theoretisch	27	31	35	38	41	42	(%)
	verschil (y-x)	-	2	6	3	0	-	(%)

[f] = verwacht uitgaande van (x) in de vaatjes 1 en 6 met daarin de ongemengde olie-grond.

De stimulering van de afbraak - en de sterkere groei van de mikroorganismen - kan veroorzaakt zijn door struktuurverbeteringen van de grond t.o.v. de crude grond en door toevoer van substraat t.o.v. de HBO-grond. De crude-grond was venig van struktuur, hetgeen zuurstof toevoer in de grondporiën belemmert. De HBO-grond bevatte weinig olie, waardoor er ook weinig olie kon worden afgebroken, maar was zandig. Een kombinatie van deze gronden leidde derhalve tot een voor mikrobiologische afbraak gunstiger verhouding tussen olie en zuurstof. Daarnaast zijn door het mengen van deze gronden mogelijk aanwezige remmende faktoren (toxische verbindingen) verdund, waardoor hun werking vermindert; hetgeen dan ook kan leiden tot een stimulering van de olie-afbraak.

A.E. Boekhold vond met HBO-grond in de sapromat een zuurstofkonsumptie van $\pm$ 35 mg O_2/g.dag bij ongeveer hetzelfde bemestingsnivo. In dit experiment is $\pm$ 77 mg O_2/g.dag gevonden. Dit verschil kan gevonden worden in de beginkonsentraties olie in de grond. A.E. Boekhold voerde haar sapromatexperiment later uit, waardoor de hoeveelheid olie in de door haar gebruikte grond lager was, vanwege afbraak op het proefterrein.

6. Eindkonklusies landfarming en aanbevelingen

Aangezien bij landfarming van met olieverontreinigde grond gebruik gemaakt wordt van het vermogen van mikro-organismen om koolwaterstoffen te gebruiken als C- en energiebron, draagt kennis over die mikro-organismen bij aan het vinden van optimale omstandigheden voor landfarming.
Uit het literatuuronderzoek is gebleken, dat veel mikro-organismen die betrokken zijn bij de afbraak van olie in grond nitraat niet kunnen gebruiken als stikstofbron en onbeweeglijk zijn. Ook is gebleken dat anaerobe afbraak van olie vrijwel niet zal plaatsvinden. Temperatuur beïnvloedt niet alleen de aktiviteit van mikro-organismen, maar ook de diversiteit van de bij de olieafbraak betrokken mikro-organismen. De slechte afbraak van zware ruwe olie wordt niet veroorzaakt door toxiciteit van komponenten. Mikro-organismen die koolwaterstoffen kunnen gebruiken als C- en energiebron hebben het vermogen emulgerende verbindingen uit te scheiden en koolwaterstoffen effektief op te nemen. Uit de experimenten is gebleken, dat temperatuurverhoging en grondbewerking de afbraak van olie kan versnellen en het ontstaan van wateroplosbare afbraakprodukten kan verminderen. Ook mengen van met olie verontreinigde gronden van verschillende oorsprong kan de afbraak versnellen. Uit het bovenstaande blijkt, dat landfarming een geschikte methode kan zijn voor de sanering van met olie verontreinigde grond,,waarbij een verhoogde afbraaksnelheid niet alleen de ekonomische haalbaarheid vergroot, maar tevens het risiko voor het milieu vermindert.

Voor landfarming kan worden aanbevolen:

- voor het begin van de landfarm een aantal analyses uit te voeren, met name oliegehalte, pH, dichtheid van de grond, NH_4^+-N, NO_3^--N, beschikbare P en drooggewicht van de grond.
- optimale toevoegingen te doen aan de hand van de verkregen resultaten voordat de grond op het terrein wordt gebracht, en deze zo intensief mogelijk met de grond te vermengen, bijvoorbeeld met behulp van een grondmolen.

- bij het opbrengen van de grond op het ingerichte terrein zorg te dragen voor een zo los mogelijk bodemstruktuur.
- in de beginperiode veelvuldig en zo volledig mogelijk de grond te ploegen. De afbouw van de frequentie kan bepaald worden door metingen van de zuurstofkonsentratie in de grond op verschillende diepten.
- in de beginperiode een zo hoog mogelijke temperatuur nastreven, bijvoorbeeld door overspanning van het terrein met landbouwplastic (oprolbaar) of gebruik te maken van afvalwarmte van bijv. elektriciteitscentrales.

7. Literatuuronderzoek: Afbraak van naftaleen door mikro-organismen.

Naftaleen is de eenvoudigste polycyklische aromaat. Het heeft de volgende fysiche en chemische eigenschappen (Verschueren, 1984):

- molekuulformule: $C_{10}H_8$
- molekuulstruktuur: 
- molekuulgewicht: 128,16
- smeltpunt: 80,2° C
- kookpunt: 217,9° C
- oplosbaarheid in water: 30 mg/L

Bij kamertemperatuur is naftaleen een witte, schilferige, vaste stof met een duidelijk herkenbare geur. (mottenballen)
Over de biologische effekten van naftaleen is het volgende vermeld: Bij 33 ppm treedt er bij de alg Chlorella vulgaris 50 % reduktie van het aantal cellen op. Bij carcinogeniteitstesten en mutageniteitstesten werden geen effekten gevonden. Naftaleen kan wel accumuleren in oesters, maar na 23 dagen zonder blootstelling is de naftaleen vrijwel verdwenen.

In dit literatuuronderzoek worden een aantal artikelen behandeld, die betrekking hebben op de afbraak van naftaleen door individuele of populaties mikro-organismen. Daarbij waren voor de uit te voeren experimenten de volgende punten van belang:

- groeisnelheid van mikro-organismen op naftaleen
- invloed van milieufaktoren
- proefomstandigheden
- afbraakrouten
- analysemethoden afbraakprodukten
- analysemethoden voor naftaleen in water

Wodzinski R.S. en Bertolini D. Appl. Microbiol. 1972/23.6: 1077-1081. "Phisical State in Which Naphthalene and Bibenzyl are Utilized by Bacteria".

In dit onderzoek is gevonden, dat de generatietijd van Pseudomonas, in een gebufferd mineraal medium bij pH = 7,0 met daarin diverse hoeveelheden naftaleen, niet beïnvloed wordt door de hoeveelheid vast naftaleen (verdubbelingstijd t_d = 1,2 uur).

Verzadigde oplossingen naftaleen werden bereid door per liter mineraal medium 1g. naftaleen te autoclaveren en vervolgens 1 week bij 30°C te bewaren. De niet oplosbare naftaleen is verwijderd door middel van een papierfilter. Bij de proeven met vast naftaleen is de naftaleen in poedervorm aan het gesteriliseerde medium toegevoegd.

De groeisnelheid is bij 30°C. bepaald door meting van het zuurstofverbruik in een gesloten vat. Het mikro-organisme was geadapteerd aan naftaleen. Deze adaptatie vond plaats in een omgekeerde petrieschaal met mineraal medium + agar in de bodem terwijl vast naftaleen was gebracht in de deksel. Via de luchtfase konden de mikro-organismen verdampte naftaleen benutten voor de groei.

Na 20 uur werden kolonies gesuspendeerd in 10 ml gedestilleerd water en gefiltreerd. In het filtraat bevonden zich voldoende cellen om als inoculum te kunnen dienen ($\pm 6,0 \times 10^6$ g cellen per 0,1 ml filtraat). De resultaten van het experiment staan in de volgende tabel:

Tabel 1. Verdubbelingstijd van een naftaleen isolaat dat groeide op naftaleen.

Fysische vorm van naftaleen	beginkonsentratie vaste naftaleen (g/L)	aantal proefnemingen	verdubbelingstijd (uur)
opgelost	geen	8	1,2 ± 0,2
opgelost(gezuiverd)	geen	3	1,2 ± 0,3
vast	0,10	7	1,2 ± 0,1
vast	1,00	7	1,2 ± 0,1
vast	4,00	7	1,2 ± 0,1

Bij alle experimenten is exponentiële groei gevonden. Tenminste 70 % van de procentuele O_2-konsumptie gaf een rechte lijn, indien de logaritme van de procentuele O_2-konsumptie tegen de tijd werd uitgezet. Bij alle experimenten daalde de O_2-konsentratie zodanig, dat deze de groei beperkte.

De onderzoekers concludeerden uit de gegevens, dat naftaleen niet in vaste vorm, maar in opgeloste vorm benut wordt door de Pseudomonas. De groeisnelheid in een mineraal medium verzadigd met naftaleen was gelijk aan de groeisnelheid in de aanwezigheid van vast naftaleen. Volgens hen is het, op basis van gelijke groeisnelheden, waarschijnlijk dat het mikro-organisme in aanwezigheid van vast naftaleen deze toch in opgeloste vorm opneemt. Verder beïnvloedde de hoeveelheid vast naftaleen de groeisnelheid niet.

Patel T.R. en Gibson D.T. Journ. Bacteriol. 1974/119.3: 879-888.
"Purification and Properties of (+)-cis-Naphthalene Dihydrodiol Dehydrogenase of Pseudomonas putida".
Een onderzoek naar de karakteristieken van het enzyme (+)-cis-Naphthalene Dihydrodiol Dehydrogenase (NDD) geïsoleerd uit Pseudomonas Putida.
NDD is geïsoleerd uit cultuurfiltraten van Pseudomonas Putida strain NP-119, die gekweekt was in een mineraal medium op 0,2% glucose en 0,2% naftaleen (per liter: 1,0g. $(NH_4)2SO_4$; 0,4g. $MgSO_4.7H_2O$; 12mg. $FeSO_4.7H_2O$; de pH werd door toevoeging van 5 N NaOH vóór sterilisatie ingesteld op 7,2.
De cellen werden geoogst bij het einde van de exponentiele groeifase en bewaard bij -15°C totdat ze nodig waren.
Het gezuiverde enzym verloor bij 4°C gedurende 11 dagen weinig van z'n aktiviteit, maar daarna nam de aktiviteit snel af.
Het pH-optimum van NDD was 9,0 ,(zie figuur 1.)

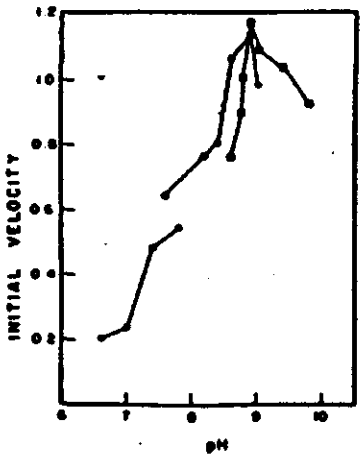


Fig. 1 *pH optimum for purified cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase. The standard assay system was used with the exception that 0.1 M buffers were used. Each cuvette was made anaerobic by alternately evacuating and flushing with nitrogen for 15 min. Each reaction was initiated by tipping cis-naphthalene dihydrodiol from the side arm of the cuvette. Initial velocity measurements are recorded as changes in absorbance at 340 nm per min. Symbols: ●, KH_2PO_4 buffer; ○, Tris-hydrochloride buffer; ■, glycine-NaOH buffer.*

Toevoeging van een aantal mineralen beïnvloedde de aktiviteit van NDD niet, maar een aantal organische inhibitors wel. Het gezuiverde enzym had NAD^+ nodig als elektronenacceptor en kon $NADP^+$ niet gebruiken. Enkele van de substraten die door NDD geoxideerd kunnen worden staan in tabel 2.

Table 2. *Substrate specificity of cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase*

SUBSTRATE	ACTIVITY*
cis-naphthalene dihydrodiol	100
cis-acenaphthene dihydrodiol	94
cis-phenanthrene dihydrodiol	91
cis-biphenyl dihydrodiol	69
cis-ethylbenzene dihydrodiol	66
cis-toluene dihydrodiol	65
cis-benzene dihydrodiol	4

*Expressed as a percentage of the activity observed with cis-naphthalene dihydrodiol. Other activity measurements were carried out as described in Materials and Methods.

De aktiviteit is voor naftaleen het hoogste.
Indien cis-naftaleendihydrodiol en NAD^+ onder aerobe omstandigheden geïnkubeerd werden met NDD, dan werd na 1 minuut het reaktiemengsel lichtgeel.

Herbes S.E. en Schwall L.R. Appl. Environm. Microbiol. 1979/35: 306-316. 'Microbial transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pristine and Petroleum-Contaminated Sediments.'
In dit onderzoek zijn de afbraaksnelheden van polycyklische aromaten in met olie verontreinigde en in schone zoetwatersedimenten bepaald. Uit beide sedimenten konden mikro-organismen geïsoleerd worden, die de PCA's konden gebruiken als enige C- en energiebron. Er werd gebruik gemaakt van ^{14}C gelabelde PCA's en de gevormde $^{14}CO_2$ werd opgevangen. De niet afgebroken PCA's en de polaire afbraakprodukten werden gekwantificeerd in extrakten van het sediment, de celgebonden ^{14}C werd gemeten in het overgebleven sediment.
In het met olie verontreinigde sediment werd voor de afbraak van naftaleen een eerste orde kinetiek gevonden en een halfwaardetijd van 4,9 uur. In figuur 1 is de verdeling van de radio-aktivteit over de verschillende frakties te zien in de tijd. De afname van ^{14}C-naftaleen gaat gelijk op met de toename van celgebonden ^{14}C; gedurende 25 dagen

blijft de polaire ^{14}C-fraktie vrijwel konstant.

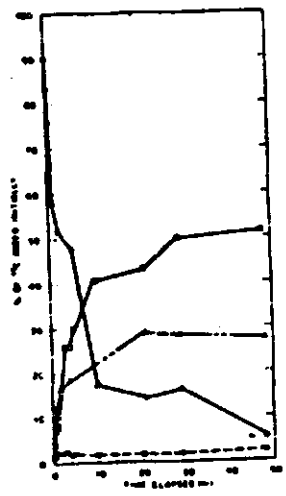


FIG. 2. *Appearance of ^{14}C in fractions during incubation of [^{14}C]naphthalene with November 9 sediment samples. Symbols:* ○, *unaltered [^{14}C]naphthalene;* ●, *polar ^{14}C fraction;* □, $^{14}CO_2$; △, *bound cellular ^{14}C.*

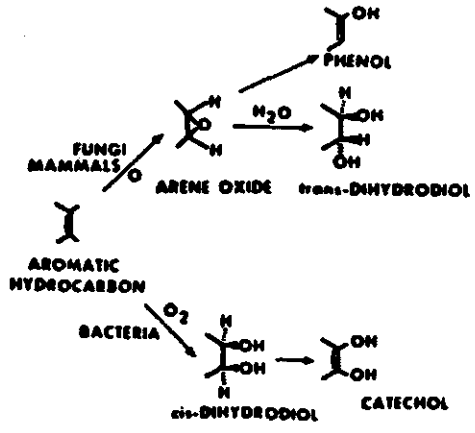
In het schone sediment is de afbraak van naftaleen gemeten gedurende 5 dagen, en daaruit is een halfwaardetijd berekend. Evenwel zullen de mikro-organismen in de schone grond voor de afbraak van naftaleen een adaptatietijd nodig hebben, en daarmee is hier geen rekening gehouden.

Cerniglia C.E., Hebert R.L., Szaniszlo P.J. en Gibson D.T. Arch. Microbiol. 1978/117: 135-143.

' Fungal Transformation of Naphthalene'

In dit onderzoek zijn 68 schimmels onderzocht op hun vermogen om naftaleen af te breken. De meeste organismen produceerden voornamelijk 1-naftol al metaboliet. Andere metabolieten waren: 4-hydroxy-1-tetralone, trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaftaleen; 2-naftol; 1,2- en 1,4-naftoquinone.

Kleinere aromatische koolwaterstoffen (van benzeen tot benzo(a)pyreen) worden door bakteriën omgezet in een cis-dihydrodiol; door zoogdieren en schimmels in transdihydrodiolen, zie figuur 3.



Figuur 3: Afbraak van naftaleen door pro- en eukaryonten.

In figuur 4 is de afbraakroute van naftaleen weergegeven voor Cunninghamella elegans.

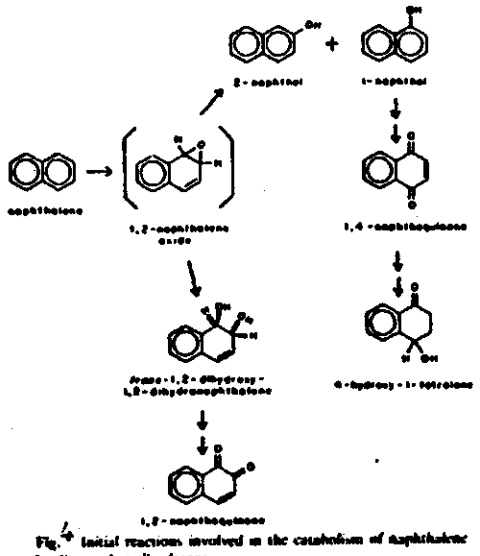


Fig. 4 Initial reactions involved in the catabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*

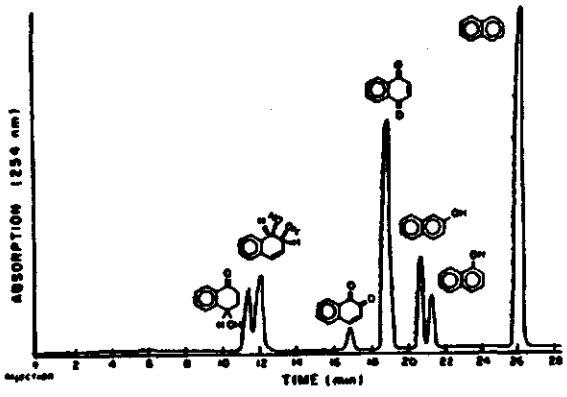


Fig. 5
Separation of naphthalene and naphthalene metabolites by high pressure liquid chromatography. A 3.9mm × 30cm analytical Waters μBondapak C_{18} column was used with a convex gradient of 50 – 95% methanol in water over 30 min. The initial flow rate was 0.4ml/min. All compounds are analytically pure and free of chromatographically or spectroscopically detectable impurities.

Deze afbraakprodukten konden m.b.v. een HPLC met UV-detektor gekwantificeerd worden, zie figuur 5.
De in dit onderzoek onderzochte schimmels (lijst niet opgenomen) zijn afkomstig uit bodem, zoet- en zeewater. In het algemeen werd in dit onderzoek gesteld, dat de kwantiteit van de afbraakprodukten afhankelijk is van nutriënten, substraatkonsentratie, zuurstofspanning, inkubatietijd, temperatuur en pH.

Cerniglia C.E. en Crow S.A. Arch. Microbiol. 1981/129: 9-13
'Metabolism of Aromatic Hydrocarbons by Yeasts.'
In dit onderzoek zijn 6 gisten onderzocht op hun vermogen om naftaleen te gebruiken als C- en nergiebron. Geen van de gisten kon naftaleen gebruiken als enige C- en energiebron, maar allen oxideerden naftaleen. Eén van de gisten - een *Candida lipolytica* stam - oxideerde naftaleen in de grootste hoeveelheden. De overige resultaten van dit onderzoek hebben betrekking op deze gist. De afbraakprodukten van naftaleen zijn onderzocht en geïdentificeerd m.b.v. HPLC, het chromatogram is opgenomen in figuur 6[1].
I bleek 1-naftol te zijn; II: 1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaftaleen; III, IV, V en VI zijn waarschijnlijk produkten die gewoonlijk gevormd worden door *Candida*, want experimenten met ^{14}C-naftaleen wezen uit, dat er in deze produkten geen radioaktiviteit was; VII bleek 2-naftol te zijn; VIII bleek net als I 1-naftol te zijn.

De uit deze resultaten afgeleide afbraakroute van naftaleen voor Candida is opgenomen in figuur 6[2].

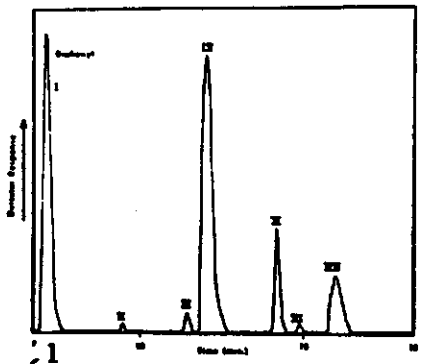


Fig. 6[1] GC trace of the TMS derivatives of biphenyl metabolites produced by *C. lipolytica*. The separation was carried out on a 2 m × 1.5 mm glass column packed with 3% OV-17 on Chromosorb Q, temperature programmed at 8 C/min from 100–250 C

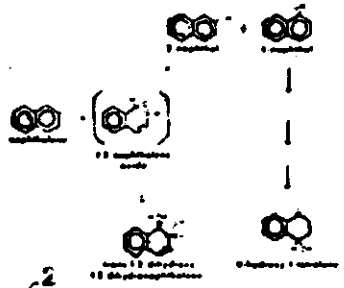


Fig. 6[2]. Pathway proposed for the oxidation of naphthalene by *C. lipolytica*

Naftaleen wordt voornamelijk omgezet in 1-naftol. De verhouding 1-naftol/2-naftol (97/3) wijst erop, dat er een voorkeur is voor de vorming van naftaleen 1,2-oxide. Daarnaast werd bewezen, dat de trans-isomeer van komponent II gevormd werd. Dit trans-isomeer wordt ook gevormd door schimmels en algen, maar door bakteriën wordt de cis-isomeer gevormd.

Fedorak P.M. em Westlake D.W.S. Water, Air and Soil Polution. 1981/ 16:367-375

'Degradation of Aromatics and Saturates in Crude oil bij Soil enrichments'

De afbraaksnelheid van naftaleen in grond is vergeleken met de afbraaksnelheid van grotere polycyklische aromaten. Er werd een mineraal medium bereid met per liter gedestilleerd water: 2g Na_2SO_4; 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g K_2HPO_4; 1g NH_4Cl; 2g KNO_3; en een spoor $FeSO_4$ bij een pH van 7,4. Voor een N- en P-vrij medium werd i.p.v. K_2HPO_4; NH_4Cl en KNO_3 gebruik gemaakt van 2g KCl.

200 ml van deze media werden in erlenmeyers geïnkubeerd bij 20°C op een schudbak met 2.0 ± 0,2g schone tuigrond en 200 ul Prudhoe Bay crude oil, ook werden er erlenmeyers met dezelfde inhoud gesteriliseerd.

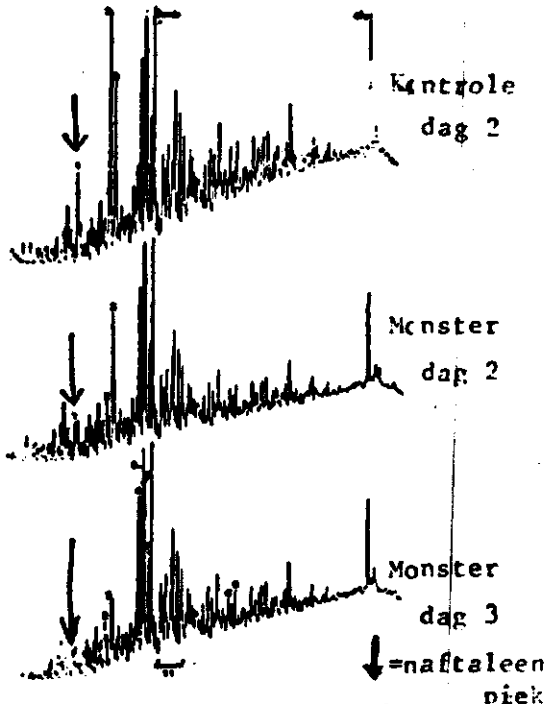
Na 2 en 3 dagen werden de media geëxtraheerd met methylchloride en vervolgens werden gronddeeltjes en water verwijderd. De aromatische en de verzadigde frakties van de olie werden gescheiden d.m.v. silikagelkolom-chromatografie. De gekonsentreerde extrakten werden ingespoten in een gaschromatograaf en de chromatogrammen van de verschillende dagen werden onderling vergeleken. In tabel 3. is een overzicht gegeven van de komponenten in de aromatische fraktie van Prudhoe Bay crude oil. Deze koolwaterstoffen komen terug in de chromatogrammen in figuur 7. Hierin zijn de chromatogrammen opgenomen van de kontrôle (bovenste) en de extrakten van de inkubaties van 2 en 3 dagen (resp. de middelste en de onderste).

TABLE 3

Identity of selected hydrocarbons in the GC analysis of Prudhoe Bay crude oil

Peak designation	Compound(s)
1	naphthalene
2	2-methylnaphthalene
3	1-methylnaphthalene
4	2, 6-, and 2, 7-dimethylnaphthalene
5	1, 3-, and 1, 6-dimethylnaphthalene
6	1, 7-dimethylnaphthalene
7	1, 4-, 2, 3-, and 1, 5-dimethylnaphthalene
hmb	hexamethylbenzene – GC marker
8	dibenzothiophene
9	phenanthrene
chr	chrysene – GC marker
10	C_1-, C_2-, and C_3-benzenes*
11	C_1-naphthalenes
12	methylphenanthrenes
13	C_2-phenanthrenes
pr	pristane
ph	phytane

* C_i denotes i alkyl carbons substituted on parent aromatic compound.



Figuur 7. GC-analyses van de aromatische frakties van Prudhoe Bay crude-oil na inkubatie van 2 en 3 dagen bij 20° C met 2 g in 200 ml medium + N en P.

Na 3 dagen is de naftaleenpiek in de ruis verdwenen. Het blijkt, dat naftaleen - in vergelijking met andere PCA's - het snelste afgebroken wordt. Er zijn geen afbraaksnelheden genoemd.

Bauer J.E. en Capone D.G. Appl. Environm. Microbiol. 1985: 81-90.
'Degradation an Mineralization of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Anthracene and Naphthalene in Intertidal Marine Sediments.'

In dit onderzoek is de afbraak van naftaleen door zeebodemmikro-organismen onderzocht en de invloed van milieu- en substraatkonsentratie-afhankelijke faktoren op de mineralisatie van naftaleen.
De experimenten zijn uitgevoerd in met zeewater verdunde sedimenten. Het aantal bakteriën in het sediment dat in staat is naftaleen en anthraceen af te breken is geteld d.m.v. uitplaten. De mineralisatie is gemeten door de CO_2-produktie in diverse tijdsperioden te bepalen. Aan de 'verdunde sedimenten' werd een bekende hoeveelheid ^{14}C gelabelde naftaleen (1(4,5,8)) toegevoegd en de CO_2-produktie werd gekwantificeerd m.b.v. headspacetechnieken. In het kader van dit verslag wordt op deze analysetechnieken niet verder ingegaan.
De afname van het substraat werd gemeten door identiek bereide monsters op diverse tijdstippen na t=0 te extraheren m.b.v. acetonitril. Na een aantal bewerkingen werd het gezuiverde monster over C_{18} Sep-Pak kolommetjes geleid en de daarin achtergebleven komponenten werden opgelost in methylchloride. Dit werd ingespoten in een HPLC met een C_{18}-kolom en een UV-detektor. De komponenten werden gekwantificeerd aan de hand van een ijklijn.
In figuur 9 is de mineralisatie van ^{14}C-gelabeld naftaleen onder aerobe omstandigheden in de tijd weergegeven. Tussen 3 en 5 dagen kan er een exponentiële groeifase geweest zijn van de mikro-organismen, maar de naftaleenafname in de tijd is konstant. Er is na 3 dagen - aeroob - een konstante CO_2-produktie tot stand gekomen. Anaeroob wordt er geen naftaleen gemineraliseerd.

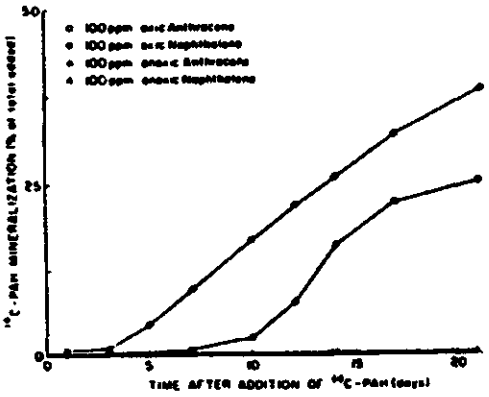


FIG. 1. Typical mineralization time series of [^{14}C]anthracene and -naphthalene by intertidal sediment slurries under anaic and anaaic conditions. All points ± standard deviation. n = two replicates.

In figuur 10 is de naftaleenafname en de mineralisatie van naftaleen (CO_2-produktie) in één figuur bijeengezet. Hier is te zien, dat na het aeroob verdwijnen van de naftaleen er nog steeds mineralisatie optreedt. Ook bij de kontrôles verdwijnt er naftaleen. Dit was te wijten aan slechte stopjes.

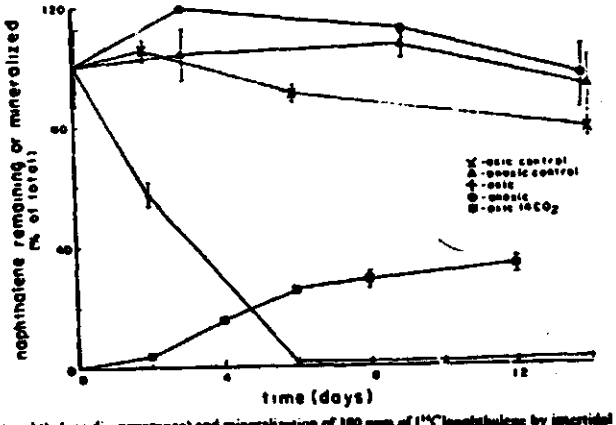


FIG. 10 Degradation (naphthalene disappearance) and mineralization of 100 ppm of [^{14}C]naphthalene by intertidal sediment slurries under oxic and anoxic conditions. All points ± standard deviation. n = three replicates.

In figuur 11 is het effekt van zuurstof op anaeroob sediment weergegeven. Het blijkt, dat zuurstof in anaeroob sediment de beperkende faktor is voor de mineralisatie van naftaleen.

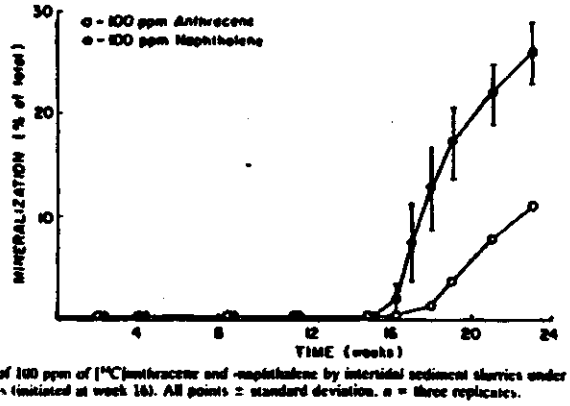


FIG. 11 Mineralization of 100 ppm of [^{14}C]anthracene and -naphthalene by intertidal sediment slurries under conditions of initial anoxia followed by oxic conditions (initiated at week 16). All points ± standard deviation. n = three replicates.

Het effekt van temperatuur op de mineralisatie is opgenoemn in tabel 4 . Bij de hogere temperaturen trad er een hogere naftaleenmineralisatie op. In tabel 3 is tevens het effekt van toevoeging van diverse konsentraties nitraat en het toevoegen van glukose voor en na adaptatie opgenomen.

Tabel 4 . Effekten van temperatuur, nitraat, glukose en zuurstofkonsentratie op de mineralisatie van naftaleen in het sediment gemeten door $^{14}CO_2$ metingen.

	maximaal gemin. N per dag(%/dag)	totaal gemin. na 14 dagen (%)	lag-periode (dagen)
10° C	1,4	8,0	
20° C	3,6	31,1	
30° C	6,2	34,9	
Nitraat (T niet vermeld)			
kontrôle	2,0	23,1	
50 uM nitraat	2,7	25,4	
500 uM nitraat	2,1	24,2	
5 mM nitraat	2,0	22,1	
Glukose voor adaptatie (T niet vermeld, inkubatietijd 13 dagen)			
kontrôle	3,4	30,2	
100 ppm glukose	3,8	30,4	
Glukose na 1-2 weken adaptatie aan 100 ppm N (T niet vermeld, inkubatietijd 7 dagen)			
kontrôle	5,0	21,6	
100 ppm glukose	3,1	23,8[1)]	
Zuurstofgehalte in lucht (T niet vermeld, inkubatietijd 14 dagen)			
0% O_2	0	0	
10% O_2	3,8	33,4	2
20% O_2	3,0	27.7	2
40% O_2	4,3	23,5	2
75% O_2	1,3	8,7	4
100% O_2	0,8	5,5	4

1)= hoge standaarddeviatie ($\pm$ 6,3)

Nitraat heeft vrijwel geen invloed op de omzetting van naftaleen tot CO_2; hoge konsentraties kunnen de mineralisatie negatief beïnvloeden. Toevoeging van glukose voor adaptatie heeft geen effekt; na adaptatie wordt alleen de maximaal gemeten mineraliesatie per dag beïnvloed, maar dan wel negatief. Het hoogste mineralisatiepercentage van naftaleen werd bereikt bij 10% O_2.

In een volgend experiment werd gevonden, dat aan naftaleen aangepaste sedimentsmikro-organismen bij 10% O_2 meer naftaleen konden mineraliseren (27,9%) dan onaangepaste (22,2%). De mineralisatie van naftaleen wordt lager bij lagere toedieningen (100 ppb) in onaangepaste sedimenten, maar is vrijwel gelijk bij hogere toedieningen (5 en 100 ppm); resp 36% en 43% na 22 dagen. In aangepaste sedimenten (100 ppm) is het percentage mineralisatie met 10 ppm hoger dan met 1, 100 en 1000 ppm; maar aanpassing met hogere konsentraties (1000 ppm) leidt tot de hoogste mineralisatie van 100 ppm naftaleen; in vergelijking met lagere aanpassingskonsentraties (zie tabel 5.).

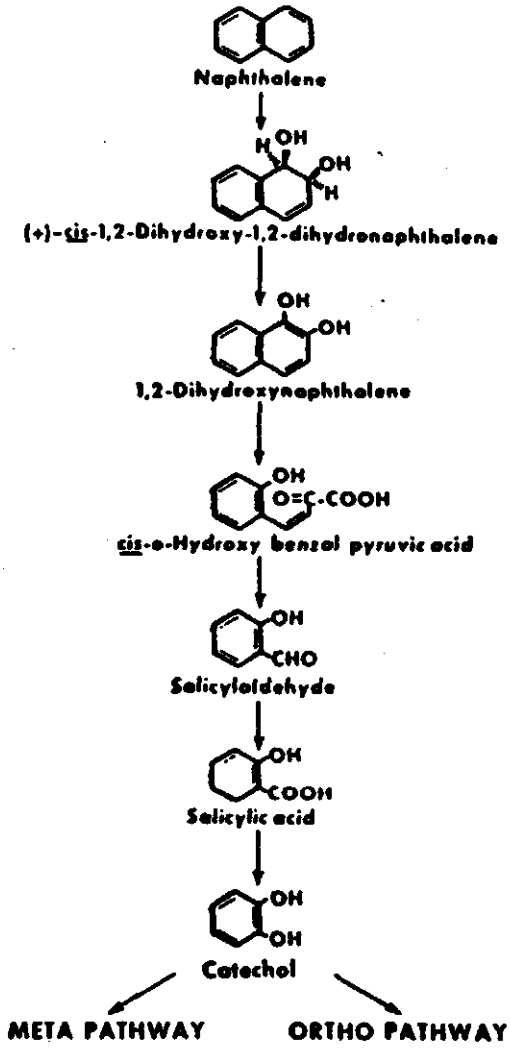
TABLE 5. Initial rates and final amounts of 100-ppm [^{14}C]-anthracene and -naphthalene mineralization by aerobic salt marsh sediment slurries after pre-exposure to the indicated concentrations of each compound

Compound	Concn (ppm)	Initial rate (%/day)[a]	Total mne (%)[a]	Lag (days)[a]
Naphthalene[c]	0	1.8 (0.23)	25.7 (4.8)	2
	10	1.2 (0.10)	29.7 (0.32)	2
	100	8.0 (0.04)***	48.0 (0.60)*	0
	1,000	10.3 (0.23)***	55.0 (0.90)**	0

[a] All values are ± standard error (in parentheses). Significant differences (by Student's *t* test) are expressed relative to 0-ppm controls (see text).
[b] 10-day pre-exposure.
[c] 7-day pre-exposure.

Samengevat blijkt uit dit onderzoek, dat naftaleen het volledigst gemineraliseerd wordt bij hogere temperaturen en 10% O_2-konsentratie in de lucht. Hoge zuurstofkonsentraties (> 40%) zijn wellicht toxisch. Anaeroob wordt er geen naftaleen gemineraliseerd. Teveel nitraat kan de mineralisatie ongunstig beïnvloeden, maar toevoeging van glukose heeft weinig zin.
Het blijkt, dat aanpassing van sedimenten invloed heeft op de mate van mineralisatie, als ook de toegediende dosis.
Mineralisatie is de mate waarin naftaleen omgezet wordt in CO_2; derhalve volledig is afgebroken tot CO_2 , H_2O en energie. Niet gemeten is, de afname van de naftaleenkonsentratie en de in afbraakprodukten en celmateriaal teruggevonden hoeveelheden. De in dit artikel gepresenteerde resultaten zijn derhalve geen maat voor de afbraak van naftaleen, en er kunnen geen afbraaksnelheden worden berekend. Ook de effekten van de diverse milieuomstandigheden, toevoeging van extra substraat en aanpassing van mikro-organismen hebben een zeer beperkte reikwijdte. Veel naftaleen-C zal omgezet worden in celmateriaal en afbraakprodukten. Zie ook het artikel van Herbes en Schwall (1979).

Atlas R.M. in "Petroleum Microbiology": 1984. Macmillan Publishing Company, New York.
In dit boek staat de afbraakroute van naftaleen voor bakteriën beschreven, zoals die gebleken is uit diverse onderzoeken (zie figuur 11).



Bakteriën beginnen de oxidatie van naftaleen met het inbouwen van beide zuurstofatomen van O_2. Daarna wordt (+)-cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaftaleen gevormd. M.b.v. NAD^+ wordt daarna 1,2-dihydroxynaftaleen gevormd. Deze dehydrogenatie wordt gevolgd door ringsplitsing die leidt tot het ontstaan van salicylaldehyde en pyruvaat. Salicylaldehyde wordt geoxideerd tot salicylzuur, dat door salicylzuurhydroxylase in catechol wordt omgezet. Catechol kan - afhankelijk van het mikroorganisme - via de metasplitsing of parasplitsing van de aromatische ring gemetaboliseerd worden.

Figuur 11. Afbraak van naftaleen tot catechol door bakteriën.

Hopper D.J. in "Developments in biodegradation of hydrocarbons 1": 1978. edited by R.J. Watkinson. Applied Science Publishers LTD, London
Hoofdstuk 3: Microbial degradations of aromatic hydrocarbons.
Uit dit boek zijn de figuren 12 en 13 overgenomen, die respektievelijk de meta- en de ortho- splitsing weergeven van catechol.

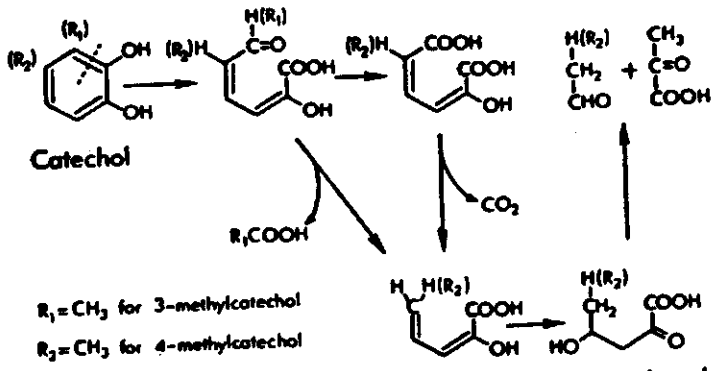


FIG. 12 The *meta* pathway for the metabolism of catechol or the substituted catechols formed during the degradation of some aromatic hydrocarbons.

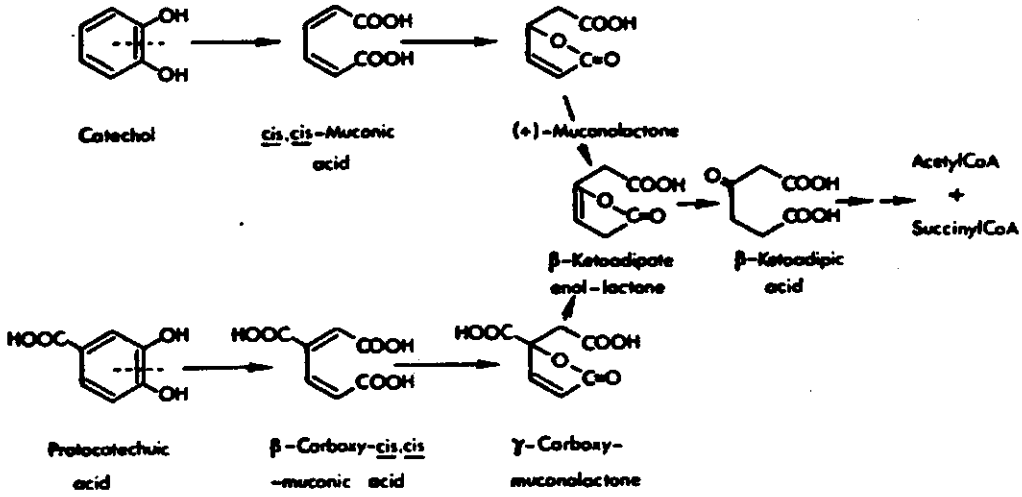


FIG. 13 The *ortho* pathway for the metabolism of catechol and protocatechuic acid.

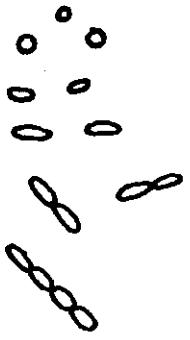
8. Isolatie van een mikro-organisme dat groeit op naftaleen als enige koolstof- en energiebron.

Uit Sinderhoevezand, een schone grond die geleverd is door het ICW. is een organisme geïsoleerd dat naftaleen kan gebruiken als enige koolstof- en energiebron.
Deze grond, met een pH van 5,2, is bekalkt met $CaCO_3$ tot een pH van 7,2. De grond is bemest met 285,7 mg NH_4NO_3, 63,6 mg KH_2PO_4 en 102,7 mg K_2HPO_4 per kg grond.
Aan deze grond is een mengsel van komponenten toegevoegd, te weten per kg grond : 2,5 g hexadecaan, 0,2 g o-xyleen, 0,9 g cyclohexaan en 1,2 g naftaleen. Deze grond is 6 weken geïnkubeerd bij 10° C.

2 gram van deze grond werd gebracht in 100 ml mineraal medium (per liter: 0,5 g $Mg_2SO_4.(H_2O)_7$; 1 g NH_4NO_3 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g K_2HPO_4 en 1 ml sporenelementenoplossing : de pH van het medium was 7,1) waaraan 0,1 g naftaleen toegevoegd werd; dit is vervolgens geïnkubeerd bij 30° C op een schudbak.

De na 24 dagen ontstane celsuspensie werd uitgestreken op gesteriliseerde bouillon agar petrischalen en in een stoof bij 30° C geïnkubeerd. Na 2 dagen werden 3 losliggende kolonies steriel uitgestreken op nieuwe gesteriliseerde bouillon agarplaten (dezelfde samenstelling als voorheen) en in een stoof bij 30° C geïnkubeerd; dit ter kontrôle van de reinheid der kolonies.
Deze 2e serie agarplaten bevatte gelijke kolonies. Van een losliggende kolonie werd in ± 1 ml steriel water een celsuspensie gemaakt en deze werd toegevoegd aan een mineraal medium met naftaleen. De fosfaatbuffer, 2,5 ml van 4 g K_2HPO_4 en 2 g KH_2PO_4 per 100 ml water (gesteriliseerd), werd toegevoegd na sterilisatie van 50 ml medium met daarin de overige mineralen in 200 ml erlenmeyers met wattenprop. Het substraat, 0,05gr naftaleen, werd na sterilisatie toegevoegd. Na een inkubatie van 2 dagen op een schudbak bij 30° C bleek het geïsoleerde mikro-organisme te groeien op naftaleen.

De naftaleensplitser (NS) werd onder de mikroskoop onderzocht. Er kwam één soort bakterie voor, een staafje met een lengte van 3-5 um en een dikte van 1-2 um (zie figuur 1)



1, 2, 3 : individuele mikro-organismen, van 2 en 3 kwamen beweeglijke exemplaren voor

4: in paren

5: in strengen van 4 cellen

Figuur 1. Vorm van het geïsoleerde mikro-organisme.

De mikroskopisch onderzochte kulture is wederom uitgestreken op bouillon en geïnkubeerd in een stoof bij 30° C. Na 1 dag werd 1 losliggende kolonie uitgestreken op schuine buizen (resp. 3 bouillon-agar en 3 gist-glukose-agarbuizen) en geïnkubeerd in een stoof bij 30° C. Op gist-glukose-agar bleek de groei sneller te zijn dan op bouillon. Na 1 dag werden deze buizen overgebracht naar een koelcel (4° C) en daar bewaard.

Alle experimenten zijn uitgevoerd met de op gist-glukose-agar bewaarde reinkultuur.

9. De groeisnelheid van de naftaleensplitsende bakterie (NS)

9.1. Inleiding

Onder groei verstaat men de toename van de verschillende celbestanddelen. Aangezien een groeiende bakteriecel maar betrekkelijk weinig kan toenemen in volume en gewicht, vindt spoedig celdeling plaats. De tijd tussen twee delingen heet de verdubbelingstijd.
De groeisnelheid is gemeten door celkulturen te bestuderen in de exponentiële groeifase. Indien de logarithme van het aantal bakteriën tijdens een periode met konstante snelheid van deling (de logarithmische of exponentiële groeifase) wordt uitgezet tegen de tijd, wordt een rechte lijn verkregen. De helling van de lijn is afhankelijk van de verdubbelingstijd. Indien het aantal bakteriën tijdens de gehele groeiperiode wordt uitgezet tegen de tijd wordt een groeikromme verkregen.

Het aantal celdelingen (n) dat er in een bepaalde tijd (t) gedurende de exponentiële groeifase heeft plaatsgevonden wordt bepaald door gebruikmaking van de volgende formule:

$$n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$$

a = aantal cellen op tijdstip 0
b = aantal cellen op tijdstip t

$$\text{De verdubbelingstijd } (t_d) = \frac{t}{n} \quad \text{(in de exponentiële fase)}$$

In de exponentiële groeifase geldt voor de toename van de biomassa (x) met de tijd (t) :

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

$\frac{dx}{dt}$ = verandering van de biomassa in de tijd (mg/l.uur)

μ = specifieke groeisnelheid
x = biomassa (mg dr.stof/l)

De specifieke groeisnelheid van een organisme is:

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t} = \frac{0,693}{t_d}$$

9.2. Metingen groeisnelheid NS met behulp van extinktiemeting

9.2.1. Inleiding

Naftaleen is een verbinding met twee aromatische ringen. De NS is in staat te groeien op naftaleen, en kan derhalve de aromatische ring openen. Aan de hand van groeiexperimenten met benzeen, tolueen, o-xyleen, anthraceen en fluorantheen is onderzocht, of de NS ook andere aromatische ringen kan openen. Ook is onderzocht, of de NS kan groeien op niet aromatische verbindingen, nl. hexadecaan en cyclohexaan.
Om te onderzoeken of deze diverse verbindingen mogelijk toxisch zijn voor de NS, zijn tevens groeiexperimenten uitgevoerd met de diverse substraten in aanwezigheid van naftaleen. Indien de groei op naftaleen wordt geremd, is er sprake van een voor de NS toxische verbinding.
Daarnaast is met behulp van extinktiemeting de invloed van de pH op de groei van de NS op naftaleen onderzocht.

9.2.2. Materiaal en methode

Vanaf één van de schuine buizen (4° C) met gist-glukose-agar werden drie nieuwe gist glukose agar buizen geënt en gedurende 1 dag geïnkubeerd bij 30° C in een stoof, daarna bewaard bij 4° C.
Uit de schuine buis werd in 10 ml steriel water een celsuspensie gemaakt; 1 ml van die celsuspensie is vervolgens toegevoegd aan gesteriliseerde 200 ml erlenmeyers met wattenprop en daarin 50 ml mineraal

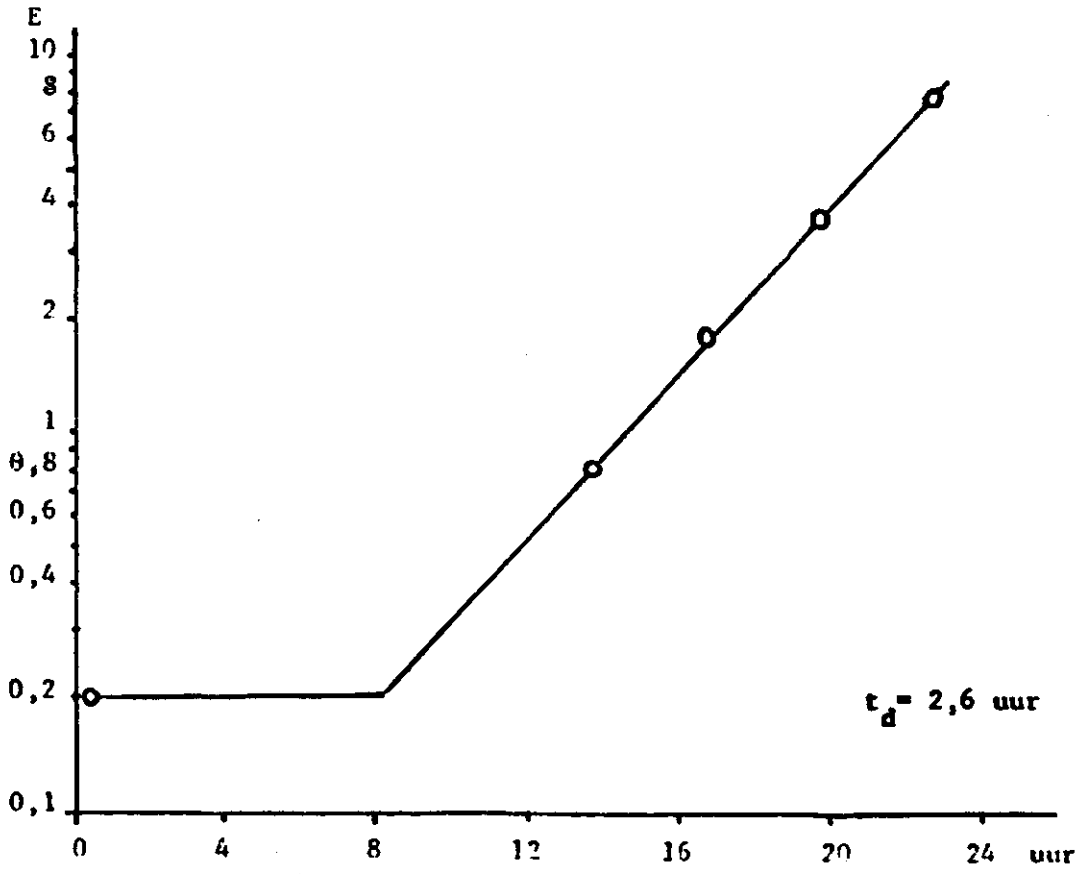
medium en:

1. diverse substraten bij pH = 7,1
2. naftaleen bij diverse substraten bij pH = 7,1
3. naftaleen bij diverse pH's

De erlenmeyers werden geplaatst op een schudbak bij 30° C.
De groeisnelheid van de NS is onderzocht door tijdens de exponentiële groeifase op diverse tijdstippen na enting de extinktie(E) te meten in een spektrofotometer (Vitatron) bij 618 nm en de logarithme van E uit te zetten tegen de tijd.

9.2.3.Resultaten groei diverse substraten

Na een adaptatieperiode van ongeveer 8 uur verliep de groei van het mikro-organisme exponentieel. In figuur 2 is de logarithme van de extinktie uitgezet tegen de tijd.



Figuur 2. De groei van de naftaleensplitsende bakterie op naftaleen bij 30° C.

De resultaten van de groeisnelheden op de diverse substraten zijn vermeld in tabel 9.1. Naftaleen, anthraceen en fluoranteen zij na sterilisatie aan het medium toegediend; de bouillon en de glukose + mineraal medium zijn gesteriliseerd.
Benzeen, tolueen, o-xyleen, cyclohexaan en hexadecaan zijn niet aan het medium zelf toegediend, maar zijn (vanwege de vloeibaarheid bij 30° C) toegediend via de luchtfase, door in de wattenprop 50 ul of 0,5 ml op te zuigen. Transport van de komponenten vindt dan plaats via de luchtfase en de kans op direkt kontakt van de cellen met het vloeibare substraat wordt zo kleiner.

substraat	toevoeging per 50 ml med	t_a (uur)	t_d (uur)	u_{max} (uur^{-1})	toevoeging per 50 ml med	t_a (uur)	t_d (uur)	u_{max} (uur^{-1})
naftaleen	0,05 g	6	2,6	0,266	0,5 g	6	2,6	0,266
benzeen	0,05 ml	-	-	-	0,5 ml	-	-	-
tolueen	0,05 ml	-	-	-	0,5 ml	-	-	-
o-xyleen	0,05 ml	-	-	-	0,5 ml	-	-	-
cyclohexaan	0,05 ml	-	-	-	0,5 ml	-	-	-
hexadecaan	0,05 ml	48-72	8	0,087	0,5 ml	48-72	8	0,087
anthraceen	0,05 g	1000	?	?	nu			
fluoranteen	0,05 g	-	-	-	nu			
glukose	0,05 g	0	2,6	0,266				
bouillon	0,05 g	0	geen exponentiële groei					

- = geen groei

? = niet te berekenen m.b.v. extinktiemetingen

Tabel 9.1. Adaptatietijd (t_a), maximale specifieke groeisnelheid (u_{max}) en de verdubbelingstijd (t_d) van NS op twee hoeveelheden substraten bij 30° C. De bij 30° C vaste substraten zijn in grammen per 50 ml medium gegeven, de bij 30° C vloeibare substraten zijn in ml per 50 ml medium gegeven.

De NS kon naast naftaleen alleen groeien op hexadecaan, en glukose en bouillon. Na 6 weken (meer dan 1000 uur) werd een lichte troebeling van het medium met anthraceen waargenomen, maar groei kon niet worden aangetoond. De cellen in het medium met anthraceen bleken na 6 weken inkubatie nog steeds te leven en waren in staat naftaleen af te breken met een maximale specifieke groeisnelheid van 0,266/uur.

9.2.4. Resultaten groei naftaleen met diverse substraten.

Omdat de NS niet groeide op een aantal substraten is onderzocht of de substraten toxisch zijn voor het mikro-organisme. Hiertoe is de invloed van deze komponenten op de groeisnelheid van het mikro-organisme op naftaleen onderzocht. De experimenten zijn op dezelfde wijze uitgevoerd als beschreven in paragraaf 9.2.3.; de resultaten zijn weergegeven in tabel 9.2.

hoeveelheid substraten per 50 ml medium	t_d (uur)	u_{max} (uur^{-1})
0,05 g naftaleen	2,6	0,266
0,05 g naftaleen + 0,05 ml benzeen	2,6	0,266
0,05 g naftaleen + 0,05 ml tolueen	3,4	0,204
0,05 g naftaleen + 0,05 ml o-xyleen	3,7	0,187
0,05 g naftaleen + 0,05 ml hexadecaan	2,6	0,266
0,05 g naftaleen + 0,05 g anthraceen	2,6	0,266
0,05 g naftaleen + 0,05 g fluoranteen	2,6	0,266
0,05 g naftaleen + 0,5 ml benzeen	-	-
0,05 g naftaleen + 0,5 ml tolueen	-	-
0,05 g naftaleen + 0,5 ml o-xyleen	-	-
0,05 g naftaleen + 0,5 ml hexadecaan	2,6	0,266
0,05 g naftaleen + 0,5 g anthraceen	2,6	0,266
0,05 g naftaleen + 0,5 g fluoranteen	2,6	0,266

Tabel 9.2. De invloed van twee hoeveelheden komponenten op de verdubbelingstijd (t_d) en de maximale specifieke groeisnelheid (u_{max}) van de NS bij groei op 1 g naftaleen per liter medium (0,05 g/ 50 ml) bij 30° C. Voor de toevoeging van de komponenten zie onderschrift bij figuur 9.1.

Het blijkt, dat 0,05 ml van de aromaten bij 50 ml medium de groei van de NS op naftaleen nauwelijks beïnvloedt, maar 0,5 ml maakte de groei van de NS op naftaleen duidelijk onmogelijk. Hexadecaan, anthraceen en fluoranteen hebben geen remmende invloed op de groei van de NS op naftaleen. Dit geldt voor zowel de toevoegingen van 0,05 ml of g, als voor 0,5 ml of g verbindingen aan 50 ml medium.

9.2.5. Resultaten groei op naftaleen bij diverse pH's.

D.m.v. groeiexperimenten bij diverse pH's is onderzocht, welk pH-optimum het geïsoleerde naftaleensplitsende mikro-organisme heeft. De diverse pH's werden bereikt door de fosfaatbuffer te veranderen; er zijn verschillende verhoudingen K_2HPO_4 en KH_2PO_4 gebruikt. Dit is bereikt door 6 g van beide zouten op te lossen in 100 ml demiwater en vervolgens diverse hoeveelheden daarvan in een ander vaatje te mengen. De berekende hoeveelheden K_2HPO_4 en KH_2PO_4 en de daarmee verkregen pH's zijn weergegeven in tabel 9.3. De verkregen specifieke groeisnelheden en de verdubbelingstijden bij de diverse pH's zijn weergegeven in tabel 9.4. Tevens is hierbij de pH vermeldt die aan het eind van het experiment in het medium is gemeten.

Tabel 9.3. De hoeveelheden K_2HPO_4 en KH_2PO_4 in grammen per 100 ml water en de op deze wijze verkregen pH's.

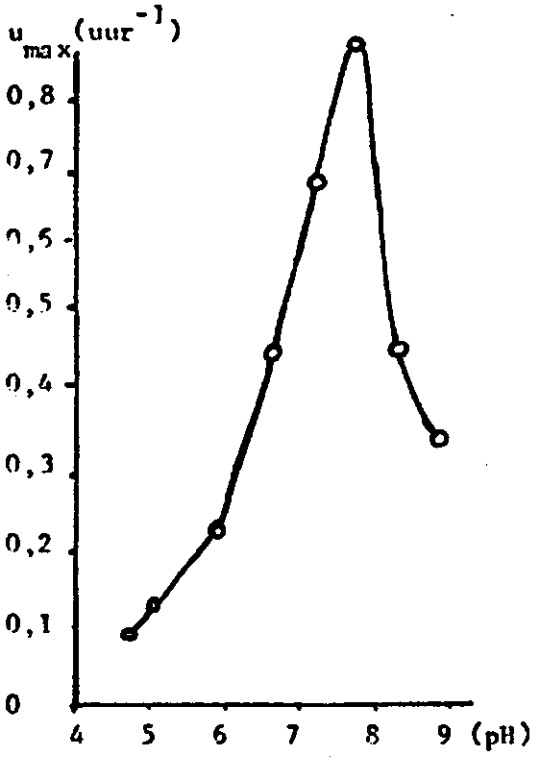
K_2HPO_4	KH_2PO_4	pH
0,1	5,9	4,7
0,2	5,8	5,1
0,5	5,5	5,9
1,2	4,8	6,7
2,3	3,7	7,2
5,3	0,7	7,7
5,8	0,2	8,3
5,9	0,1	8,8

Deze oplossingen zijn gesteriliseerd, 2,5 ml werd toegevoegd aan 50 ml gesteriliseerd overig medium.

Tabel 9.4 De groei van de NS op naftaleen bij diverse pH's (30° C). (t=tijd in uren)

pH (t=0)	4,7	5,1	5,9	6,7[x]	7,2[x]	7,7[x]	8,3[x]	8,8
E (t=0)	0,120	0,113	0,098	0,230	0,216	0,221	0,219	0,082
E (t=8)				0,417	0,451	0,469	0,402	
E (t=11)				1,638	3,58	5,65	1,627	
E (t=18)	0,211	0,343	0,842					1,124
E (t=21)								3,21
E (t=24)	0,328	0,804	3,42					
t_d (uur)	8	5	3	1,5	1	0,8	1,5	2
u_{max} (uur^{-1})	0,087	0,139	0,231	0,462	0,693	0,866	0,462	0,347
pH (t=24)	4,3	4,9	4,2	6,5	6,8	7,0	7,2	7,2
pH (kontrole)	4,8	5,2	6,0	6,7	7,1	7,7	8,3	8,7

[x]= De media met deze pH's zijn vóór de metingen 15 uur in een koelcel geplaatst bij 4 graden C.

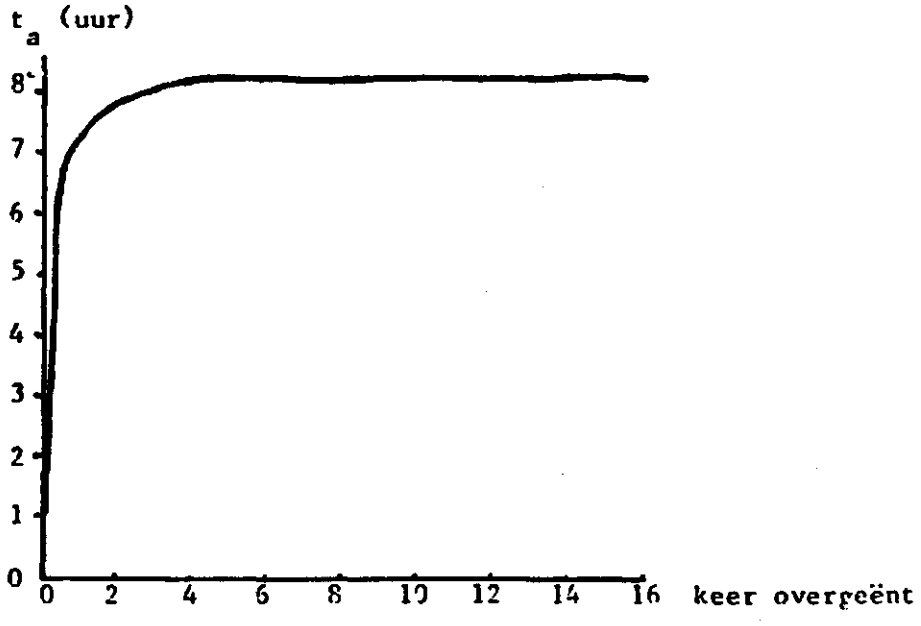


Figuur 3. Het effekt van de pH op de maximale specifieke groeisnelheid.

De omstandigheden waren bij dit experiment hetzelfde als bij de voorafgaande experimenten. Het mikro-organisme is gevoelig voor de pH en heeft een pH-optimum van ± 7,7. Opvallend is, dat bij alle experimenten de pH na 24 uur lager is dan de kontrole (niet geënte) en dan in het begin. Dat kan komen omdat de pH-buffer verandert door opneming van fosfaat door de MS of doordat er zure reaktieprodukten ontstaan.

9.2.6. Overenten.

Het is gebleken dat het geïsoleerde mikro-organismen door veelvuldig overenten niet hun vermogen verliezen om naftaleen af te breken; de adaptatietijd is door overenten echter wel groter geworden. Dit is getest door aan het eind van het onderzoek één van de drie schuine gist-glukose-agarbuizen, die aan het begin van ieder onderzoeksonderdeel zijn gemaakt, en een serie steeds overgeënte buizen te enten op 50 ml mineraal medium (pH = 7,1) met 0,05 g naftaleen en de groei te volgen bij 30° C (schudbak) m.b.v. E-metingen.
De verdubbelingstijd was in alle buizen gelijk; 2,6 uur, maar de oudste buis had duidelijk een veel kortere adaptatietijd dan de overige buizen, nl. minder dan 1 uur. De overige buizen hadden een adaptatietijd van 7-8 uur. Het verloop van de adaptatietijd is opgenomen in figuur 4.



figuur 4. De invloed van overënten op de adaptatietijd.

9.2.7. Diskussie en konklusies

Het geïsoleerde mikro-organisme is in staat te groeien op naftaleen, maar groeit op anthraceen, fluoranteen, benzeen, tolueen en o-xyleen kon niet aangetoond worden. De toediening van de vluchtige aromaten vond plaats via de luchtfase, waardoor er te weinig substraat is het medium zou kunnen geraken. Maar bij proeven met hexadecaan, dat op dezelfde wijze werd toegediend, werd wel groei gekonstateerd.
Het is gebleken, dat anthraceen en fluoranteen niet toxisch zijn voor het mikro-organisme, en lage dosis benzeen ook niet. Tolueen bleek in lage dosis, net als xyleen, de groei te remmen, maar minder dan o-xyleen. In hoge dosis remden alle gebruikte mono-aromaten de groei volledig.
Op naftaleen groeide het mikro-organisme exponentieel. De verdubbelingstijd bij pH = 7,2 was 2,6 uur, hetgeen een u_{max} van 0,266 oplevert. De pH is van grote invloed gebleken op de groeisnelheid, en er is een optimum gevonden bij pH = $\pm$ 7,7. Deze registratie is evenwel gebaseerd op weinig E-metingen, en om die reden zijn de gemeten extinkties tevens in de resultaten vermeld. Daarnaast zijn 4 van de pH's gedurende 15 uur direkt na enting bewaard bij 4° C, en pas daarna geïnkubeerd bij 30° C op de schudbak. Maar deze koeling kan de groeisnelheid niet beïnvloeden. Daarnaast is uit de experimenten gebleken, dat de pH's na afloop steeds lager waren dan in het begin, en ook lager dan de pH's van niet-geënte media, die bij de groei als referenties dienden. Er is geen oorzaak gevonden voor deze verschuivingen, maar m.i. kan het twee oorzaken hebben: doordat de fosfaat wordt gebruikt voor zowel de buffering van het medium als voor de groei van het mikro-organisme, kan tijdens de groei de buffer verlopen. Maar het kan ook zijn dat de pH verandert door het ontstaan van zure afbraakprodukten in het medium.
Uit de testen met overenten blijkt, dat bij een vers van naftaleen geënt mikro-organisme op gist glukose agar sneller weer aan naftaleen is aangepast dan meerdere malen op gist glukose agar overgeënte mikro-organismen. Blijkbaar worden de enzymen voor de afbraak van naftaleen na voortdurende toevoer van een 'gebruikelijk' substraat afgebroken, maar niet door alle individuen gelijktijdig, gezien het verloop van figuur 4. Bij hernieuwde aanvoer van naftaleen moeten de enzymen blijkbaar opnieuw worden geïnduceerd.

Bij alle experimenten bleek na afloop de pH lager te zijn dan in het begin, en lager dan de kontrôle. Dit kan veroorzaakt zijn door:

- het ontstaan van zure afbraakprodukten in het medium
- opname van fosfaat door de mikro-organismen, waardoor de buffer verliep.

9.3. De groeisnelheid van NS gemeten met behulp van het O_2-verbruik.

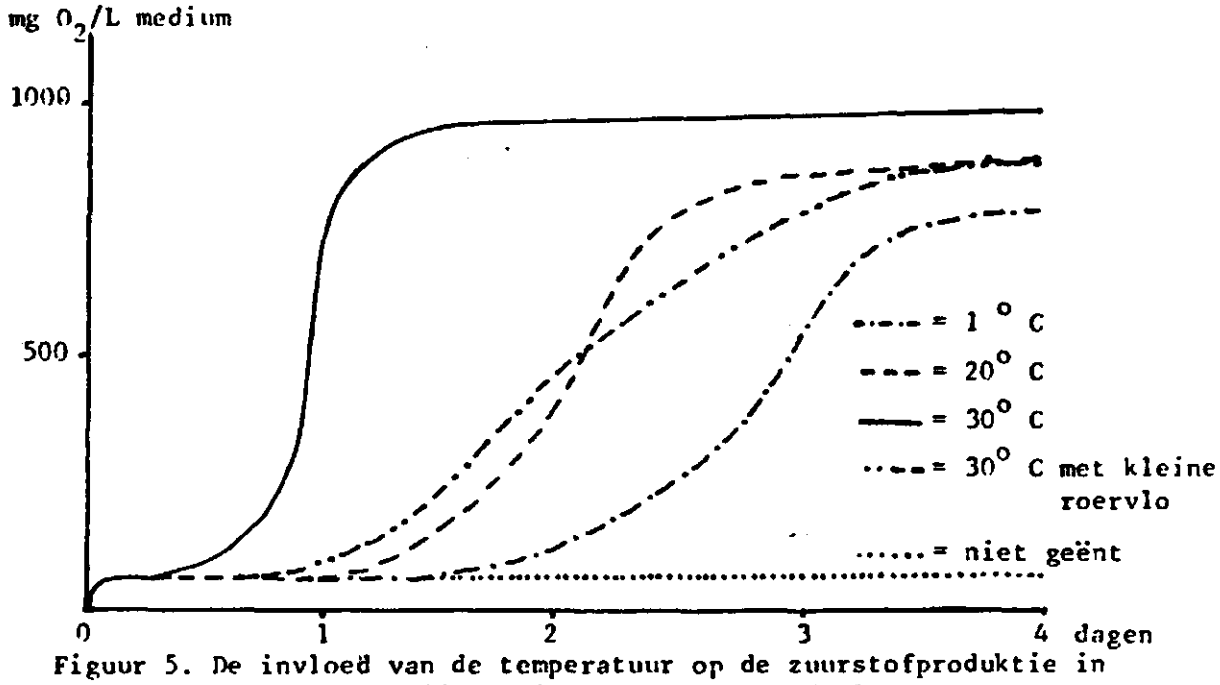
9.3.1. Materiaal en methode

Het zuurstofverbruik van een kulture is gemeten m.b.v. een sapromat (zie bijlage 4) bij diverse temperaturen. Vanaf één van de schuine buizen (4° C) met gist glukose agarmedium werden drie nieuwe gist glukose agarbuizen geënt en gedurende 1 dag geïnkubeerd bij 30° C in een stoof; daarna bewaard bij 4° C.
Uit deze schuine buis werd in 10 ml steriel water een celsuspensie gemaakt; 1 ml van deze celsuspensie werd toegevoegd aan 100 ml mineraal medium + 0,1 g naftaleen in elk der vaatjes van de sapromat, vervolgens werden de vaatjes gesloten en de sapromat werd ingeschakeld. De pH van het medium was 7,1. De vaatjes werden geroerd door een grote roervlo zodat er overal voldoende zuurstof kon doordringen.
Omdat de sapromat niet gesteriliseerd kon worden, zijn deze experimenten niet steriel uitgevoerd.

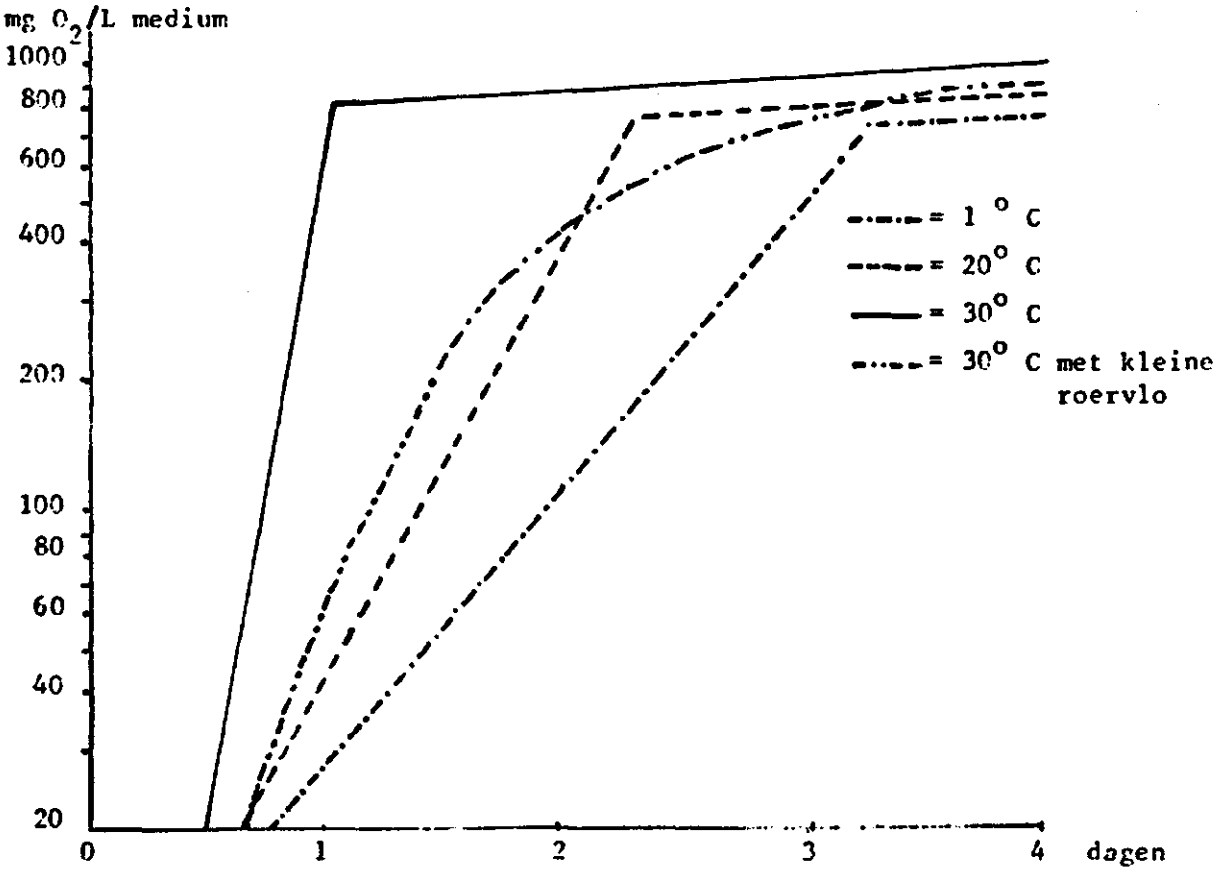
Naast de effekten van de temperatuur op de groeikurve is tevens het effekt van O_2-gebrek meegenomen. Tijdens het eerste experiment bleek dat de gebruikte roervlooien niet voldoende aëratie gaven in de vaatjes en dat daarom geen exponentiële groei werd bereikt.
Daarnaast werden deze roervlooien ook gebruikt voor andere analyses waar veel metalen in voorkwamen, en ook zware metalen; waarschijnlijk zijn daarom in de beginfase een paar kultures niet aangeslagen en verliep het experiment niet zoals gepland.

9.3.2. Resultaten

De resultaten van de metingen van de O_2-konsumptie in de kultures geroerd met de grote roervlo staan vermeld in figuur 5. In figuur 6 is de logarithme van de O_2-konsumptie tegen de tijd uitgezet. De tijdsduur, waarin de O_2-konsumptie verdubbelt tijdens de exponentiële groeifase, is bij 30° C: 2,6 uur, bij 20° C: 8 uur en bij 15° C: 12 uur.



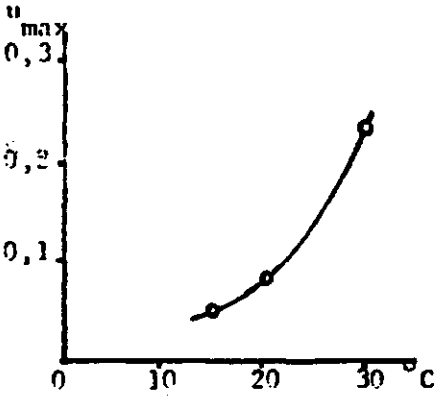
Figuur 5. De invloed van de temperatuur op de zuurstofproduktie in de sapromat bij groei van de NS op naftaleen.



Figuur 6. De invloed van de temperatuur op de zuurstofkonsumptie van de NS bij groei op naftaleen. De logarithme van de zuurstofkonsumptie is hier uitgezet tegen de tijd.

In de figuren 5 en 6 zijn tevens de resultaten opgenomen van het eerst uitgevoerde experiment bij 30° C, waarbij bleek, dat de gebruikte roervlo te klein was. Hierdoor is er in het medium zuurstofgebrek ontstaan en er treedt duidelijk geen exponentriële groei op. De groeisnelheid wordt dan bepaald door de diffusiesnelheid van de zuurstof naar het medium.

Uit de meetresultaten bij de diverse temperaturen kan de maximale specifieke groeisnelheid (u_{max}) worden afgeleid. De u_{max}-waarden voor de 3 temperaturen zijn opgenomen in figuur 7. Bij een temperatuurverhoging van 10° (Q_{10}) wordt de groeisnelheid met een faktor 3 verhoogd.



Figuur 7. De invloed van de temperatuur op u_{max} van de NS met naftaleen als substraat.

Het blijkt, dat bij een lagere temperatuur de groeisnelheid van de NS bij groei op naftaleen afneemt, maar ook zuurstofgebrek leidt tot remming van de groei.

De kulturen bevatten 1 g naftaleen/L medium. Voor de volledige omzetting van 1 g naftaleen is 3000 mg zuurstof nodig. Na 100 uur is bij de 3 temperaturen de volgende percentages van de theoretisch mogelijke 3000 mg zuurstof verbruikt:

temperatuur (° C)	gemeten O_2-verbruik (mg/L medium)	% van theoretisch mogelijke (3000 mg/L medium)
30	950	31,5
20	850	28
15	760	25
30 (O_2-gebrek)	860	28,7

Het zuurstofverbruik van de kultuur is berekend door van de gemeten zuurstofproduktie de bij een niet-geënt medium geproduceerde zuurstof (50 mg/L medium) af te trekken.

Naarmate bepaalde milieuomstandigheden ongunstiger worden, wordt er minder naftaleen omgezet in CO_2; en worden er dus meer afbraakprodukten en/of celmateriaal gevormd.

9.3.3. Diskussie en konklusies

De groeisnelheid vandde NS in de sapromat was bij 30° C net zo groot als bij 30° C op een schudbak, nl. u_{max} = 0,266. Bij onvoldoende toevoer van zuurstof werd de groei geremd, en was er geen sprake meer van exponentiele groei.
De temperatuur had een duidelijke invloed op de groeisnelheid. De Q_{10} is gewoonlijk 2 à 3, en hier is een Q_{10} van 3 gevonden. In dit opzicht gedraagt het mikro-organisme zich 'normaal'.
Bij 30° C wordt er voor de afbraak van naftaleen door de NS relatief de meeste zuurstof gebruikt, nl. 31,5 % van het theoretisch mogelijke. Zowel minder zuurstof als een lagere temperatuur geven een lager percentage.

10. Afbraaksnelheid van naftaleen

10.1. Inleiding

De afbraaksnelheid is de snelheid waarmee een substraat uit een medium verdwijnt. In dit geval is de snelheid bepaald, waarmee 0,1 g naftaleen verdwijnt uit 100 ml medium (pH = 7,1) bij diverse temperaturen.
Dit experiment is uitgevoerd in een sapromat bij 30, 20 en 15° C. Dezelfde opstelling is gebruikt voor de meting van de zuurstofkonsumptie.(zie 9.3.) en een onderzoek naar afbraakprodukten (zie 11).

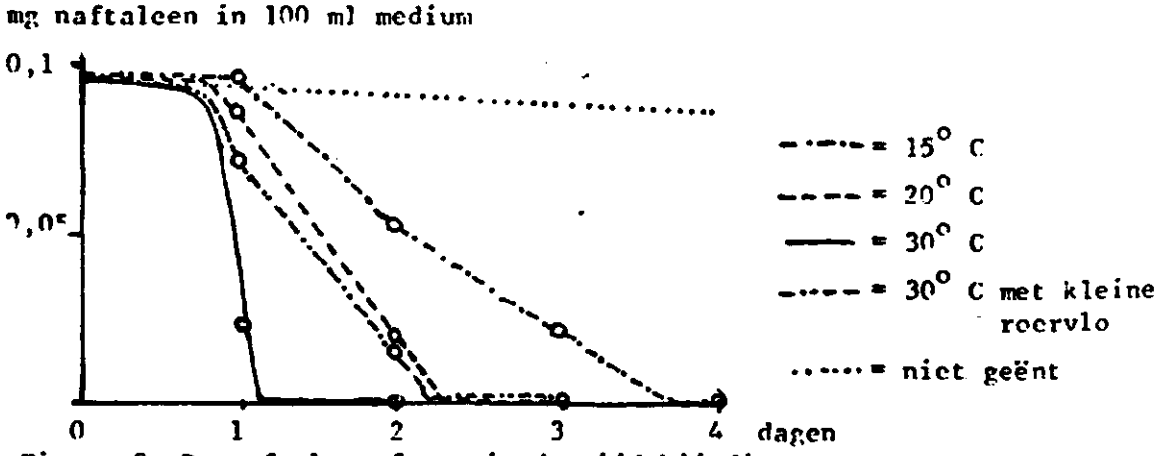
10.2. Materiaal en methode

Het principe van de sapromat staat beschreven in bijlage 4. De inhoud van de vaatjes is beschreven in 9.3.1. Na 0, 1, 2, 3 en 4 dagen zijn de vaatjes uit de sapromat verwijderd; 5 ml van het medium is gebruikt voor onderzoek naar afbraakprodukten; de rest - inklusief niet-opgelost naftaleen - is geëxtraheerd met hexaan (zie bijlage 3.) De naftaleenkonsentraties zijn bepaald met een HPLC.
Er is gekontroleerd of er na de hexaanextraktie van naftaleen uit het medium nog naftaleen aan cellen geadsorbeerd kan zijn.
In 100 ml medium zijn na beëindiging van de groei op 0,1 g naftaleen de cellen gedood m.b.v. $HgSO_4$. Daarna is er 0,1 g naftaleen aan toegevoegd en is het medium gedurende 3 dagen bij kamertemperatuur bewaard. Hetzelfde werd gedaan bij een steriel medium zonder cellen. Daarna zijn beide media geëxtraheerd met n aceton
geanalyseerd in de HPLC. De beide extrakten bleken evenveel naftaleen te bevatten.
Verder is na extraktie van het medium bij 15° C het overgebleven medium gecentrifugeerd en zijn de mikro-organismen via aceton-hexaan geëxtraheerd. (De cellen zijn geschud met 50 ml aceton en hieraan is 100 ml hexaan toegevoegd. Vervolgens is de aceton verwijderd door extraktie

met water). Dit hexaan is op gelijke wijze als de overige hexaanextrakten via opneming in acetonitril geanalyseerd op aanwezigheid van naftaleen. Deze analyse wees uit, dat er aan de cellen geen naftaleen was geadsorbeerd, die via een aceton-hexaan extraktie kon worden aangetoond.
Indien er verlies van naftaleen door het afpipeteren van 5 ml voor andere analyses ontstaat, dat kan dit maximaal verantwoordelijk zijn voor een verlies van 5 %. Maar dit percentage ligt waarschijnlijk lager, want bij het pipeteren is opzuigen van niet opgelost naftaleen vermeden.

10.3. Resultaten

De recovery van de naftaleenextraktie was 85 %, d.w.z. indien 0,1 g naftaleen werd toegevoegd aan 100 ml medium en er 5 ml uitgepipetteerd werd en de rest direkt geëxtraheerd werd op de beschreven wijze, dan werd er 0,085 g naftaleen teruggevonden met deze analysemethode. De resultaten van deze analyses zijn weergegeven in figuur 8. Bij 30° C is na 1 dan 75 %, en na 2 dagen 100 % van de naftaleen verdwenen. Bij 20° C is na 1 dag 20 %, na 2 dagen ook 100 % verdwenen. Bij 15° C is na 1 dag 1 %, na 2 dagen 35 %, na 3 dagen 75 % en na 4 dagen 100 % van de naftaleen verdwenen. Ook hier zijn de resultaten van de vaatjes met de te kleine roervlo gegeven. Dan is bij 30° C na 1 dag 25 %, na 2 dagen 80 % en na 3 dagen 100 % verdwenen.



Figuur 8. De naftaleenafname in de tijd bij diverse temperaturen en een beginkonsentratie van 0,1 g naftaleen per 100 ml medium.

In de figuur is duidelijk te zien, dat bij de hogere temperatuur de naftaleen het snelst is verdwenen. Deze resultaten sluiten goed aan bij de eerder beschreven resultaten van de zuurstofkonsumpties bij deze temperaturen, waarbij bij de hoogste temperatuur de zuurstofkonsumptie het snelste toenam, en het eerst z'n maximum bereikte.

10.4. Diskussie en konklusies

De analyse van naftaleen leidde tot een verlies van 15 %. Dit kan veroorzaakt zijn door:

- onvolledige extraktie met hexaan
- adsorptie van naftaleen aan de mikro-organismen
- verlies van naftaleen door het pipeteren van 5 ml madium voor andere analyses
- verliezen door indampen van het hexaanextrakt
- de in de analyse beschreven heroplossing van naftaleen in water.

De geringe afname van de naftaleenkonsentratie in het niet-geënte vaatje is waarschijnlijk veroorzaakt door adsorptie van naftaleen aan de natronkalk van de sapromatopstelling (zie bijlage 4). Na 4 dagen rook de kalk sterk naar naftaleen, maar deze is niet geanalyseerd.

Het is waarschijnlijk dat hexaan alle vrije naftaleen heeft meegeextraheerd. Naftaleen lost goed op in hexaan. In het verslag van A.E. Boekhold is gekontroleerd, of de hexaanextraktie van naftaleen uit grond volledig is. Uit die resultaten blijkt, dat hexaan alle naftaleen meeneemt. Het is waarschijnlijk dat hetzelfde voor de extraktie van naftaleen uit een vloeibaar medium geldt.

Een verlies van 15 % kan niet verklaard worden door het pipetteren van 5 ml van het medium voor analyse van afbraakprodukten, waarbij kan ten hoogste 5 % verlies optreden.

De konsentraties waarin naftaleen werd heropgelost in water lagen ver beneden de oplosbaarheid van naftaleen in water. Het is dan ook niet waarschijnlijk dat de opgetreden verliezen verklaard kunnen worden uit het niet oplossen van de naftaleen in het geanalyseerde water.

De meest waarschijnlijke oorzaak ligt in het indampen van het hexaan-extrakt (van 300 ml tot 0 ml). Met name in de laatste fase werd nogal eens naftaleen geroken bij het overleiden van N_2 over de laatste 5 ml.

De resultaten van deze naftaleenanalyses wijzen uit, dat bij de hogere temperatuur de afbraak van naftaleen het snelst plaatsvindt, maar ook de beschikbare zuurstof in het medium is van belang. Indien er onvoldoende toevoer van zuurstof is, verloopt de afbraak van naftaleen langzamer.
Deze resultaten zijn in overeenstemming met de resultaten die beschreven zijn in 9.3.2.

11. Onderzoek naar afbraakprodukten in de tijd bij diverse temperaturen (pH = 7,1) en bij diverse pH's (T = 30° C).

11.1. Materiaal en methode

In de gebruikte sapromat (zie 9.3.2. voor resultaten zuurstofkonsumptie bij diverse temperaturen) waren 5 vaatjes operationeel. (Zie bijlage 4. voor de werking van een sapromat.) Deze vaatjes zijn 5 maal ingezet onder wisselende omstandigheden. Tijdens de eerste serie bleek, dat de gebruikte roervlooien te klein waren, waardoor in het medium zuurstofgebrek ontstond. De tweede, derde en de vierde serie waren de temperatuurproeven bij de afbraak van naftaleen. De vijfde serie werd gebruikt om de afbraak van anthraceen door de NS te onderzoeken.

Bij de diverse temperaturen werden 5 vaatjes teglijk ingezet, en op diverse tijdstippen na enting geanalyseerd. Eén van de vaatjes werd gebruikt als kontrole, die wel naftaleen bevatte, maar niet werd geent. De overige vaatjes werden na resp. 24, 48, 72 en 96 uur verwijderd en direkt bewerkt voor diverse analyses.

Het onderzoek naar de afbraakprodukten is verricht m.b.v.:

- TOC (Total Organic Carbon, zie bijlage 3)
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography, zie bijlage 3)

Met behulp van een pipet is 5 ml uit het medium genomen en dit werd gedurende 20 minuten gecentrifugeerd bij 3000 rpm. De supernatant is m.b.v. een schone pipet overgebracht in een glazen flesje met kunststof dopje (± 7 ml) en direkt daarna is 200 ul geïnjekteerd in de HPLC; De TOC-analyses werden op 1 tijdstip uitgevoerd en tot dat moment zijn de flesjes bewaard bij 4° C.

De overige 95 ml uit de sapromatvaatjes is gebruikt om de naftaleenkoncentratie te bepalen. Dit is beschreven in hoofdstuk 10.

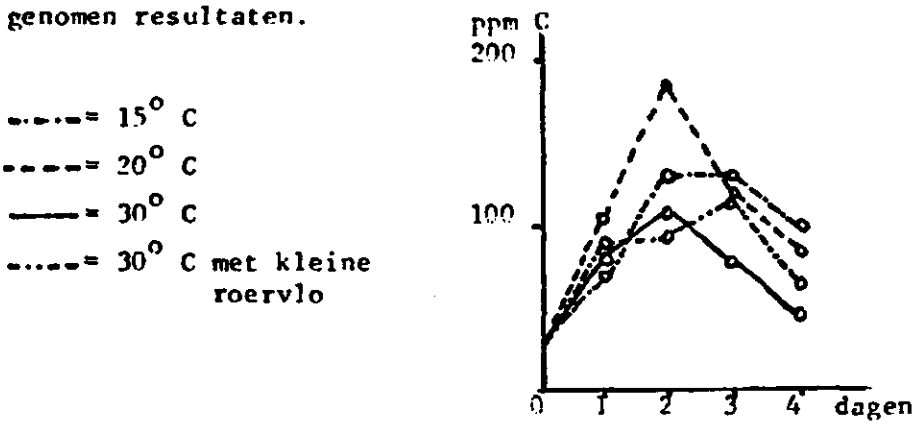
In de TOC-analyse wordt de totale hoeveelheid organisch C in het medium bepaald, een maat dus voor de totale hoeveelheid opgeloste afbraakprodukten plus de opgeloste hoeveelheid substraat. In de HPLC-analyse worden de individuele afbraakprodukten zichtbaar, en de hoeveelheid opgelost substraat.

De individuele afbraakprodukten zijn niet geïdentificeerd, wel kan hun affiniteit tot water met acetonitril vergeleken worden met die van een aantal verwante komponenten, nl. 1-naftol en catechol.

11.2. Resultaten

11.2.1. TOC-bepalingen van de temperatuurproef

Aan de hand van een ijklijn met konsentraties van 0, 20, 50, 100, 150 en 200 ppm C leidden de TOC-analyses tot de in figuur 9 opgenomen resultaten.

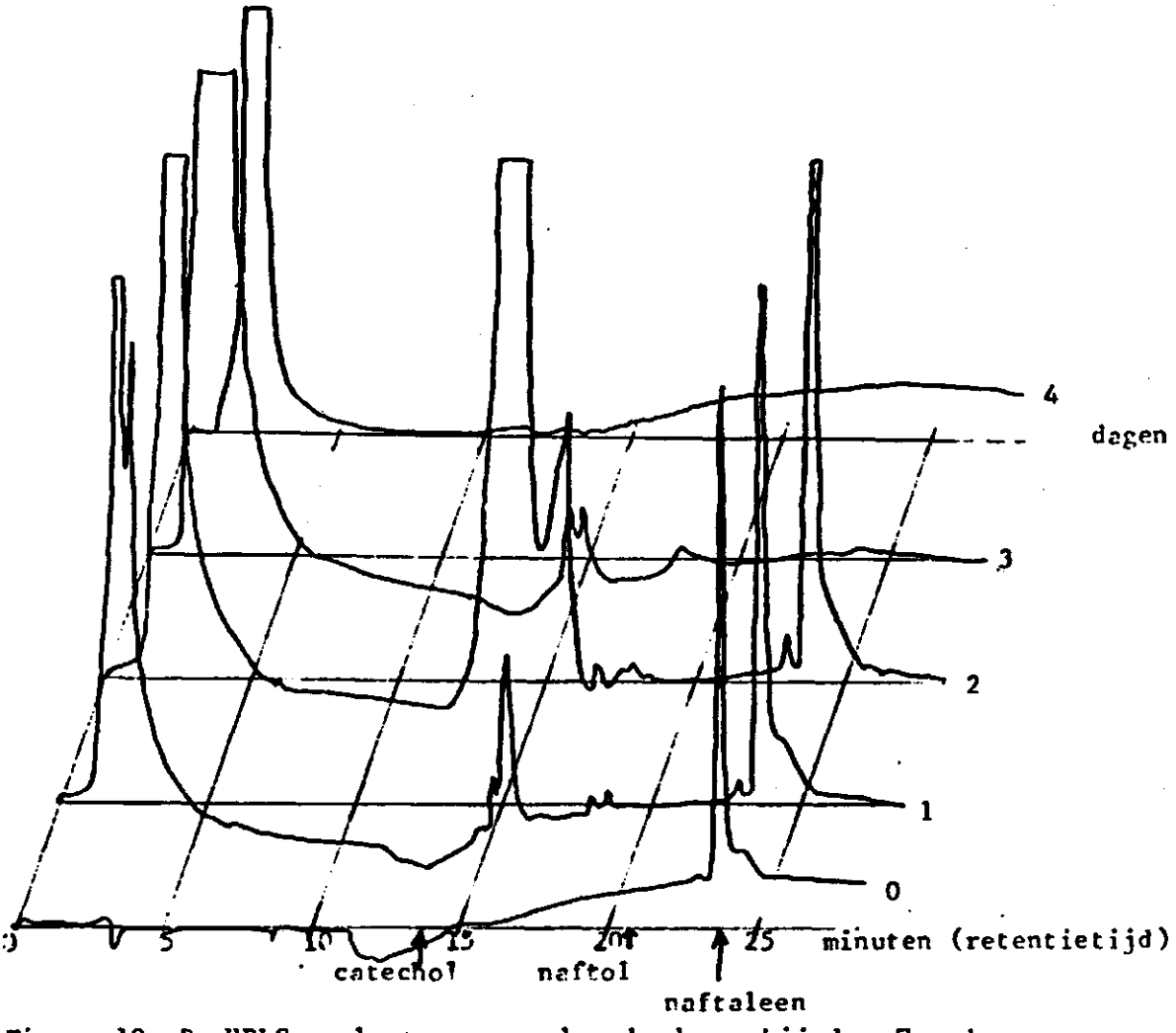


Figuur 9. Resultaten van de TOC-analyses met een aanvangskonsentratie van 1000 ppm naftaleen.

Ook hier is de analyse van de serie met de te kleine roervlo tevens in de figuur opgenomen. De hoogste TOC-waarde is gemeten na 2 dagen bij 20° C, maar na 4 dagen heeft de hoogste temperatuur (30° C) de laagste TOC-waarde en de laagste temperatuur (15° C) de hoogste TOC-waarde. Ook is te zien, dat het gebrek aan zuurstof de TOC-waarde verhoogt.

11.2.2. HPLC-analyses van de temperatuurproef

In het programma van de HPLC (zie bijlage 3) had naftaleen een retentietijd van 24,3 ± 0,5 minuten, 1-naftol 21,0 ± 0,5 minuten en catechol 13,6 ± 0,5 minuten. Hoewel uit de literatuur gebleken is dat 1-naftol geen afbraakprodukt van de bakteriële afbraak van naftaleen is, is 1-naftol als een referentiekomponent gebruikt, aangezien er geen andere geschikte komponenten voorhanden waren.

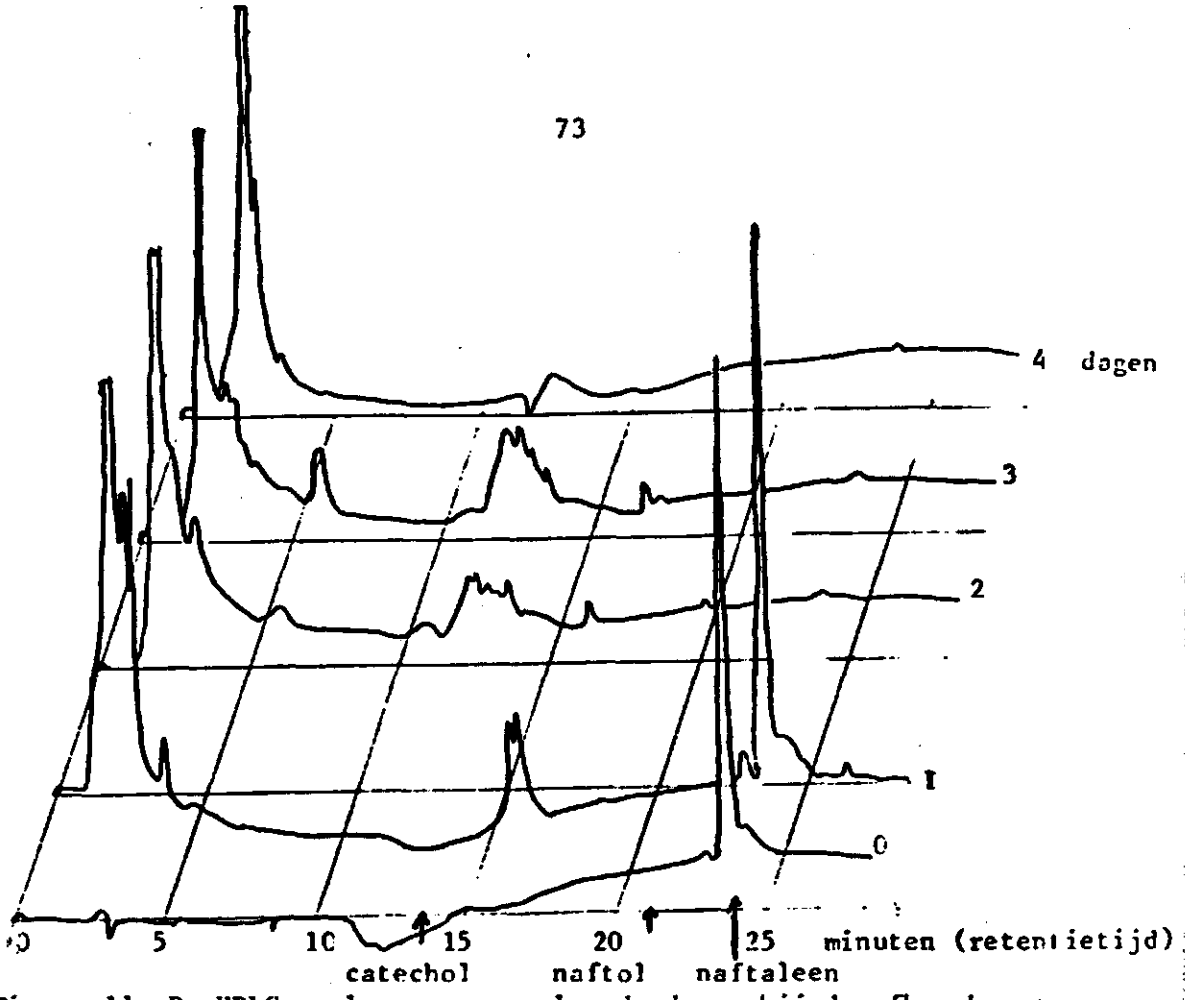


Figuur 10. De HPLC-analyses op navolgende dagen bij de afbraak van naftaleen door NS bij 15° C.

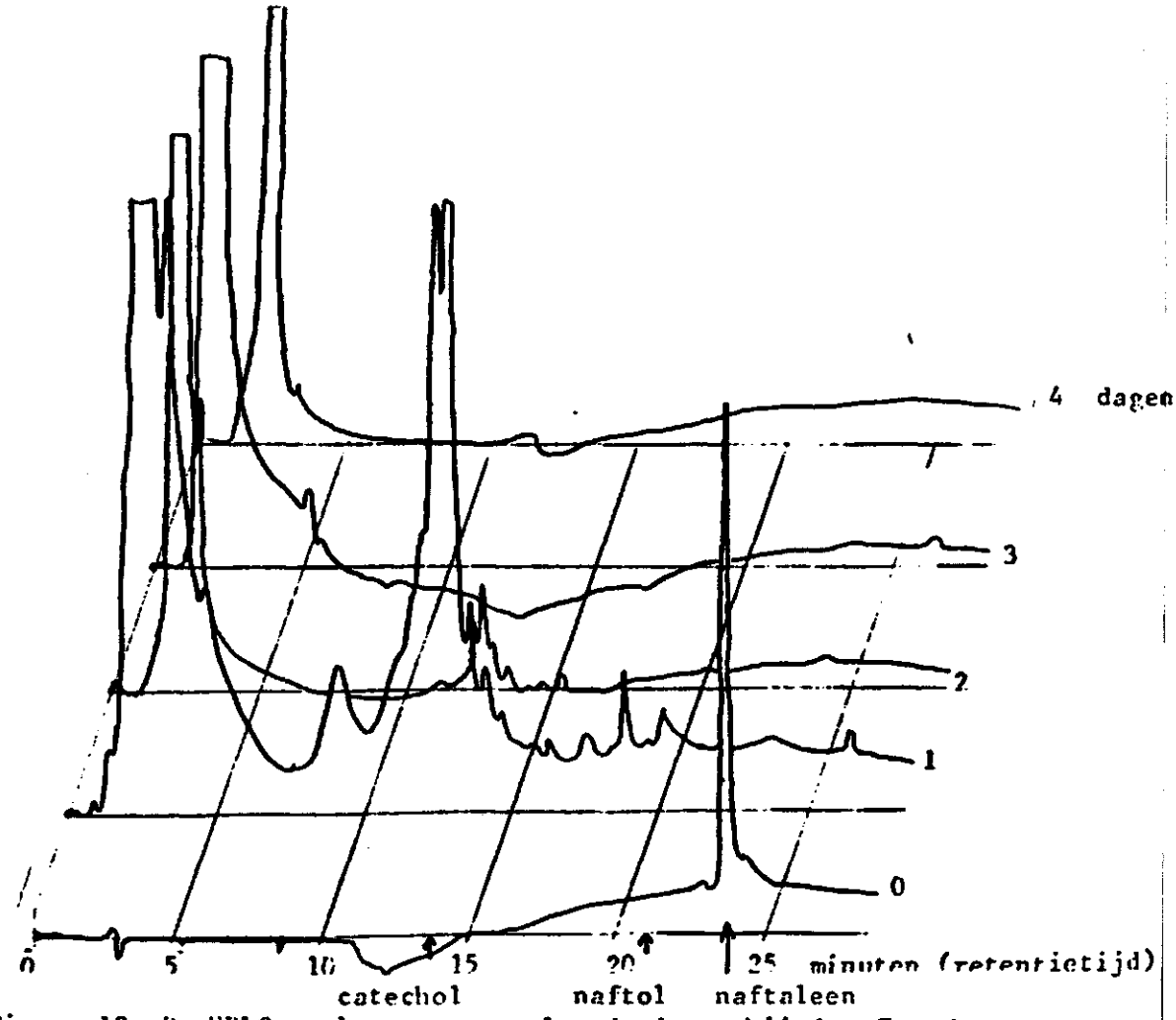
In figuur 10 is te zien, dat naftaleen bij 15° C op de derde dag na inkubatie is verdwenen, maar op de tweede dag zijn er de meeste afbraakprodukten zichtbaar. Zonder inkubatie (de 0-de dag) is er tussen 0 en 5 minuten geen piek, de overige dagen wel. Hier is waarschijnlijk sprake van normale metabolieten, en niet van specifieke afbraakprodukten van naftaleen.

In figuur 11 is te zien, dat naftaleen bij 20° C op de tweede dag is verdwenen, en er zijn veel minder afbraakprodukten zichtbaar, maar wel met ongeveer dezelfde retentietijden als die van 15° C. Ook hier onstaan na de eerste dag produkten met een retentietijd tussen 1 en 5 minuten, maar in mindere mate dan bij 15° C.

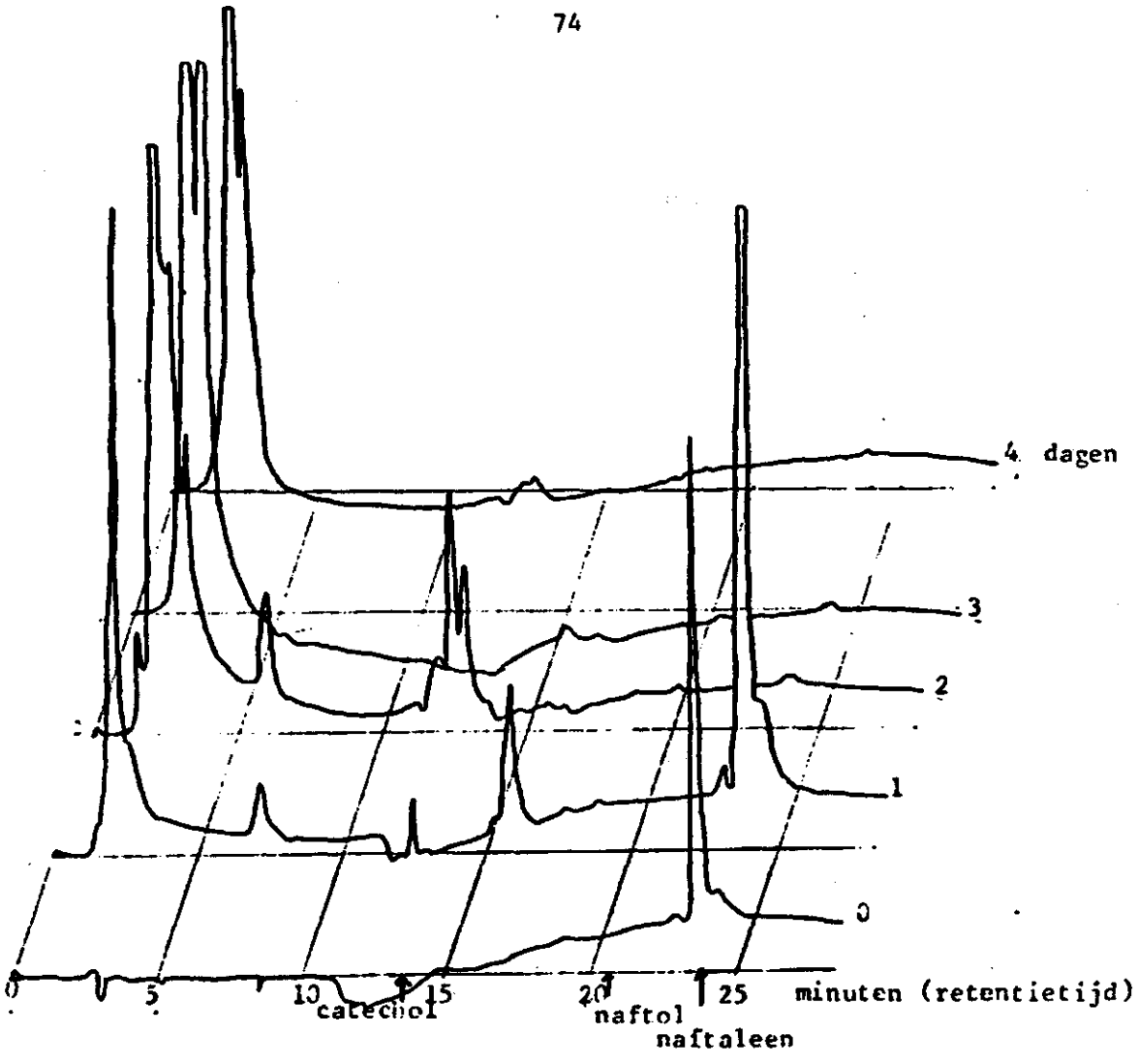
In figuur 12 is te zien, dat naftaleen bij 30° C op de eerste dag al is verdwenen uit het chromatogram, maar er zijn dan wel veel afbraakprodukten in het medium aanwezig. De piek tussen 1 en 5 minuten is breder dan bij 20° C.



Figuur 11. De HPLC-analyses op navolgende dagen bij de afbraak van naftaleen door NS bij 20° C.



Figuur 12. De HPLC-analyses op navolgende dagen bij de afbraak van naftaleen door NS bij 30° C.



Figuur 13. De HPLC-analyses op navolgende dagen bij de afbraak van naftaleen door NS bij 30° C met een kleine roervlo.

In figuur 13 is te zien, dat naftaleen bij 30° C en een (te) kleine roervlo in het medium niet al op de eerst dag is verdwenen, maar pas op de tweede dag.

11.2. . TOC-bepalingen van de pH-proef

Van een aantal van de monsters van het experiment beschreven in 9.3.1. is na 1 dag de TOC bepaald. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5.1.

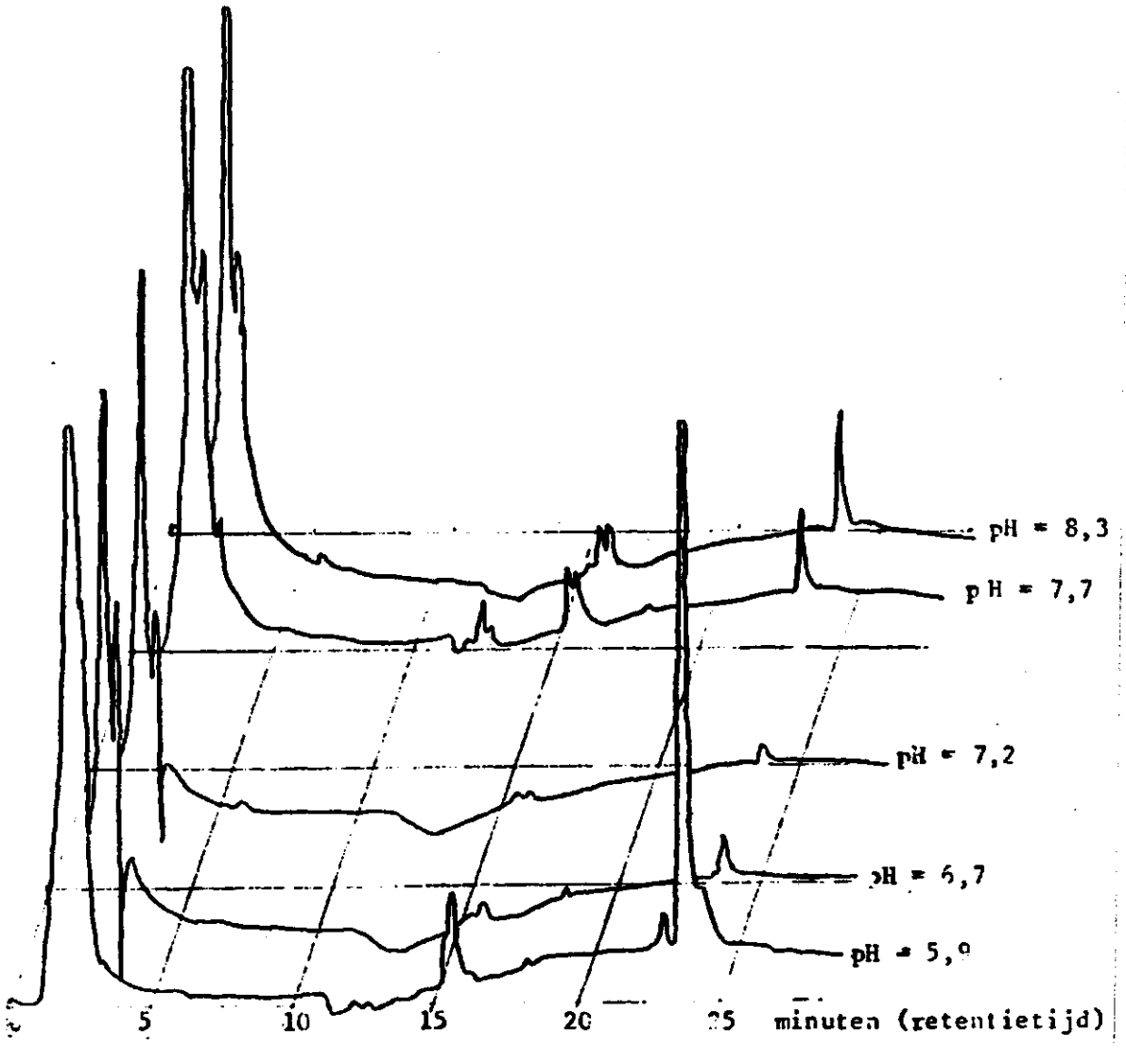
Tabel 5.1. TOC gehalten bij diverse pH's, groei op 0,05 g naftaleen in 50 ml minaraal medium bij 30° C.

pH bij aanvang	pH na 1 dag	TOC (ppm C)
5,9	4,2	82
6,7	6,5	41
7,2	6,8	39
7,7	7,0	40
8,3	7,2	39

Uit de tabel blijkt, dat er bij pH = 5,9 de hoogste TOC-waarden zijn gemeten, de TOC-waarden voor de andere pH's lopen niet ver uiteen.

11.2.4. HPLC-analyses van de pH-proef

Dezelfde monsters als uit 11.2.3. zijn ingespoten in de HPLC. De resultaten zijn opgenomen in figuur 14. Hierin is te zien, dat



Figuur 14. De HPLC-analyses van media met oplopende pH's na 1 dag inkubatie bij 30° C van NS met 1 g naftaleen/l. medium.

bij pH = 7,2 de minste afbraakprodukten ontstaan, en bij pH = 5,9 de meeste, van de gesteste pH's.
Bij pH = 5,9 is er ook de meeste naftaleen opgelost in het medium.

11.3. Diskussie en konklusies.

De mikro-organismen zijn vóór de analyses afgecentrifugeerd; de eventueel hieraan geadsorbeerde afbraakprodukten zijn derhalve niet zichtbaar in de chromatogrammen. Verder is het mogelijk, dat exo-enzymen wèl in de supernatant zitten, waardoor de afbraak niet (volledig) stopte na afcentrifugeren van de mikro-organismen. De monsters zijn evenwel snel bewerkt en direkt daarna ingespoten in de HPLC, deze chromatogrammen geven derhalve een goed beeld van de op dat moment in het medium opgeloste komponenten. Op andere tijdstippen genomen monsters kunnen echter een ander beeld geven. De monsters voor de TOC-analyses zijn wel langere tijd bewaard, zodat daarin veranderingen kunnen zijn opgetreden.

Kortdurende aanwezigheid van - mogelijk grote hoeveelheden - afbraakprodukten op andere dan de gemeten tijdstippen is niet uitgesloten. Maar de algemene lijn - dat bij hogere temperatuur met voldoende toevoer van zuurstof de verbindingen het snelst volledig worden omgezet in 'normale' goed wateroplosbare metabolieten - zal hierdoor niet veranderen.

De 'normale' metabolieten zullen in de HPLC-kolom vrijkomen, als er alleen water als loopvloeistof wordt gebruikt (0 - 5 minuten). Bij het temperatuurexperiment komen na 4 dagen alle pieken in deze fase, en alle toegediende naftaleen is dan volledig omgezet. De chromatogrammen van de tussenliggende dagen geven aan, dat een aantal afbraakprodukten voor korte tijd kunnen ophopen in het medium, maar dat deze produkten in een later stadium weer worden benut.

De algemene lijn in de TOC- en de HPLC-resultaten komt overeen, maar de verhoudingen van de resultaten kunnen verschillen. Dit kan veroorzaakt worden doordat:

- de TOC-analyses niet direkt na monstername zijn uitgevoerd
- de gevoeligheid van de detektie na de HPLC voor de diverse afbraakprodukten verschillen kan.

Uit de TOC-analyses van de diverse pH-monsters blijkt, dat er in het medium bij pH = 5,9 2 maal zoveel organisch C zit dan bij de hogere pH's. Uit de HPLC-analyses blijkt, dat veel van dit organisch C naftaleen is; uit deze analyses blijkt tevens, dat er bij de gebruikte pH's geen ophoping van bepaalde afbraakprodukten ontstaat na 24 uur bij 30^{o} C.

12. Afbraak van anthraceen.

12.1. Materiaal en methode.

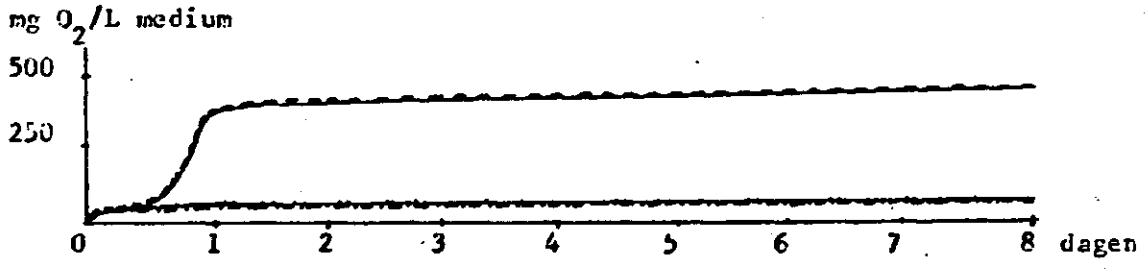
Direkt na de isolatie van de NS uit de grond is onderzocht, of dit mikro-organisme in staat is om ook anthraceen en fluorantheen af te breken. Na ongeveer 6 weken inkubatie bij 30° C op een schudbak werd een troebeling van het medium waargenomen bij anthraceen. Bij fluorantheen is over een periode van 13 weken geen troebeling waargenomen.
Het medium met anthraceen is mikroskopisch onderzocht op mikro-organismen, uitgestreken op bouillon agar platen ter kontrôle van de reinheid van de kulture en geënt op een medium met naftaleen. Uit deze testen bleek, dat het mikro-organisme (nog) dezelfde uiterlijke kenmerken had als de oorspronkelijke NS, maar alleen de vormen 1, 2 en 3 uit figuur 3.1. kwamen voor, dat de kulture rein was en dat het mikro-organisme - met een adaptatietijd van 1 uur en een verdubbel ingstijd van 2,6 uur - groeide op naftaleen.
In een bepaald medium is de afname van het substraat een maat voor de groeisnelheid van een mikro-organisme. De metingen van de anthraceen koncentratie via hexaanextraktie gaven onvoldoende nauwkeurige resultaten, anthraceen lost namelijk vrij slecht op in hexaan. De groei van het mikro-organisme op anthraceen is daarom onderzocht m.b.v. meting van het O_2 verbruik in de sapromat, en HPLC-analyses van het medium.
In de sapromat zijn bij 30° C 5 vaatjes geïnkubeerd gedurende 8 dagen. De vaatjes bevatten 100 ml mineraal medium en:

- 0,1 g anthraceen, niet geënt (1)
- 0,1 g anthraceen, geënt (2)
- 0,05 g anthraceen + 0,05 g naftaleen, niet geënt (3)
- 0,05 g anthraceen + 0,05 g naftaleen, geënt (4)
- 0,05 g naftaleen, geënt. (5)

Daarna is 5 ml van ieder der vaatjes ontdaan van mikro-organismen op de eerder beschreven wijze en is 200 ul geïnjecteerd in de HPLC.

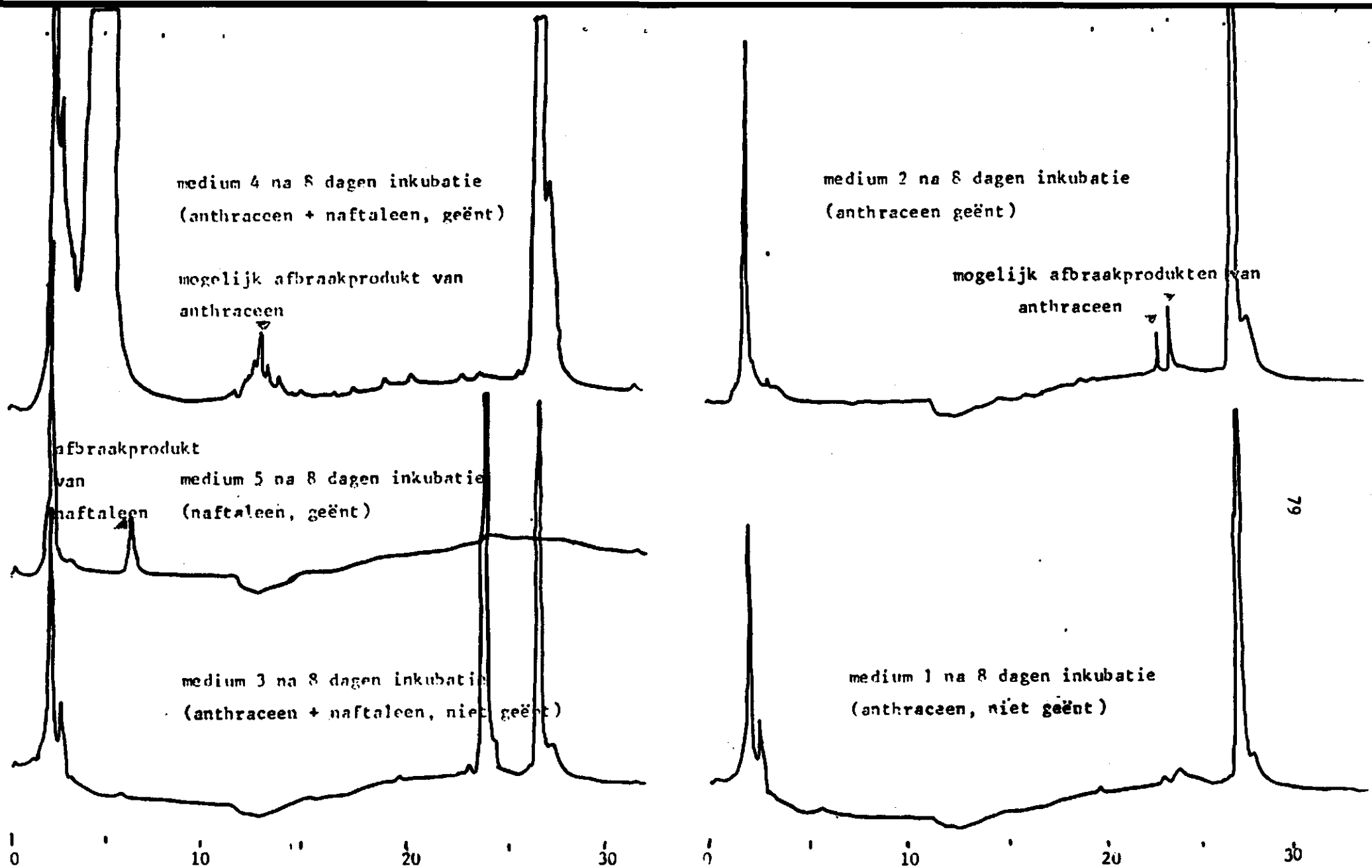
12.2. Resultaten

De resultaten van de zuurstofproduktie in de sapromat zijn weergegeven in figuur 15. Gedurende de 8 dagen van het experiment waren de zuurstofprodukties in de vaatjes 1, 2 en 3 gelijk, en uit deze waarden kan gekonkludeerd worden, dat er in die vaatjes geen noemenswaardige afbraak van substraten kan hebben plaatsgevonden. Ook indien de mikro-organismen konden groeien op naftaleen (vaatje 4) bleek uit de meting van de zuurstofproduktie niet, dat aanwezig anthraceen werd afgebroken. De zuurstofproduktie in vaatje 4 zou dan immers groter moeten zijn dan in vaatje 5.



Figuur 15. De zuurstofproduktie in de vaatjes met daarin media met anthraceen en/of naftaleen bij 30° C.

De resultaten van de HPLC-analyses van de media zijn weergegeven in figuur 16. Hier zijn wel duidelijke verschillen waarneembaar. Er ontstaan in vaatje 4 heel andere afbraakprodukten dan in vaatje 5. Ook vaatje 2 geeft een enkele afwijkende piek te zien. De retentietijd van anthraceen is 26,8 ± 0,5 minuten. De vóór die tijd zichtbare pieken kunnen afbraakprodukten van anthraceen zijn. Uit deze chromatogrammen blijkt, dat de NS in geringe mate anthraceen kan omzetten tot beter wateroplosbare produkten dan anthraceen. Deze produkten komen niet voor in niet-geënt medium met anthraceen (vaatje 1). In het medium, waar door de aanwezigheid van naftaleen veel meer cellen aanwezig zijn (vaatje 4) komen beter wateroplosbare afbraakprodukten voor. Maar gezien de zuurstofproduktiés in deze vaatjes is de mate van afbraak uiterst gering.



Figuur . De chromatogrammen van de HPLC-analyses van de media na 8 dagen inkubatie in de sapromat bij 30° C.

12.3. Diskussie en konklusies.

Anthraceen lost slecht op in hexaan. Hoewel de voorlopige NEN-norm voor de analyse van anthraceen wel gebruik van hexaan als extraktiemiddel voorschrijft, konden op deze wijze geen bruikbare resultaten worden verkregen. Ook kon de groeisnelheid van de NS op anthraceen niet bepaald worden d.m.v. extinktiemetingen, daarvoor nam de vertroebeling van het medium te langzaam toe. De test in de sapromat om d.m.v. O_2 gebruik metingen de groeisnelheid te berekenen leidde ook niet tot resultaten. Toch wijzen de HPLC-resultaten erop, dat de NS in staat is anthraceen om te zetten, omdat er extra pieken ontstaan.

13. Eindkonklusies afbraak van naftaleen door een reinkulture.

In de literatuur (Wodzinski, et al. 1972) is een verdubbelingstijd (t_d) van Pseudomonas bij groei op naftaleen (30° C en pH=7,0) gevonden van 1,2 uur. De t_d van het in dit rapport beschreven geïsoleerde mikro-organisme was (30° C en pH=7,2) 2,6 uur, maar bij pH=7,7 werd een t_d van 0,8 uur (30° C) gevonden. Ook uit de andere vermelde literatuur blijkt, dat de groei van mikro-organismen op naftaleen - en daarmee de afbraak van naftaleen - goed verloopt. De groei op andere aromaten - door het geïsoleerde mikro-organisme - kon niet worden aangetoond. Bij anthraceen en fluoranteen ontbrak het vermogen tot afbraak, maar bij de geteste mono-aromaten kan de toxiciteit van deze verbindingen een rol hebben gespeeld.

De invloed van de pH op de afbraaksnelheid bleek groot te zijn. Bij pH=4,7 was de groeisnelheid 10 x lager dan bij het optimum (7,7). Maar de pH bleek ook van invloed op de hoeveelheid wateroplosbare afbraakprodukten. Bij de laagste pH (verloop van 5,9 naar 4,2 in 24 uur) waren er tweemaal zoveel aanwezig als bij een pH rond het optimum.

De invloed van de temperatuur was tevens aanzienlijk. De Q_{10} van het mikro-organisme was 3, d.w.z. dat bij een temperatuurverhoging van 10° de groeisnelheid verdrievoudigd wordt. Maar ook op het ontstaan van wateroplosbare afbraakprodukten had de temperatuur invloed. Bij 30° C ontstonden er 50 % minder wateroplosbare afbraakprodukten na 4 dagen inkubatie dan bij 15° C.

Daarnaast is uit deze experimenten gebleken, dat voldoende toevoer van zuurstof ook belangrijk is voor de groeisnelheid en het ontstaan van wateroplosbare afbraakprodukten. Bij onvoldoende zuurstof wordt de groei geremd en ontstaan er meer wateroplosbare afbraakprodukten.

Uit dit onderzoek blijkt, dat milieufaktoren als pH, temperatuur en zuurstofkonsentratie de afbraaksnelheid van naftaleen aanzienlijk kunnen beïnvloeden. Tevens is gebleken, dat deze milieufaktoren de hoeveelheid in water oplosbare afbraakprodukten beïnvloeden. Bij gunstiger omstandigheden ontstaan er minder wateroplosbare afbraakprodukten.

Deze resultaten sluiten aan bij het in hoofdstuk 4 t/m 7 beschreven landfarmingsonderzoek. Ook daar bleek bij gunstiger milieuomstandigheden niet alleen de afbraak van olie in grond toe te nemen, maar tevens de hoeveelheid wateroplosbare afbraakprodukten af te nemen.

bijlage 1:

i c w - p r o j e k t : b i o l o g i s c h e r e i n i g i n g v a n v e r v u i l d e g r o n d d o o r m i d d e l v a n 'l a n d f a r m i n g'

Het ICW is in 1985 begonnen met een proefprojekt landfarming in samenwerking met de Vuil Afvoer Maatschappij VAM. Het doel van het projekt is:

- ervaring opdoen met de praktische uitvoerbaarheid van het landfarmingsprocede
- de kosten in relatie met het reinigingsresultaat te analyseren
- de methode in relatie met de kosten en milieuhygienische aspekten te evalueren.

Bij gebleken geschiktheid kan de methode worden ingezet voor reiniging van vervuilde grond, die vrij komt bij bodemsaneringsoperaties.

Het onderzoek wordt uitgevoerd op een daarvoor speciaal ingericht terrein bij het afvalverwerkingsbedrijf van de VAM in Wijster. Het terrein, ter grootte van 2000 m2 (50 m * 40 m) is opgedeeld in twee proefvelden van elk 1000 m2. De bodem is ter plaatse afgedicht met folie om grondwaterverontreiniging te voorkomen. Op de folie is een drainagesysteem aangebracht in een 40 cm dikke zandlaag en er zijn voorzieningen getroffen voor opvang en bemonstering van de drainafvoer. Afhankelijk van de kwaliteit wordt het drainwater afgevoerd naar een zuiveringsinstallatie of worden geloosd op het oppervlaktewater.

Het 'landfarmings'-terrein is opgedeeld in twee proefterreinen, zodat twee soorten vervuilde grond kunnen worden behandeld, namelijk zandgrond uit Veenendaal met gasolie en venige grond van de NAM uit Schoonebeek met ruwe olie.

De vervuilde grond is opgebracht in een laag van ongeveer 45 cm dikte. Door de grond te bewerken is de olie zo homogeen mogelijk door de grond verdeeld.

Vervolgens is de grond bemest met stikstof en fosfaat en afhankelijk van de pH is de grond ook bekalkt. De grondbewerking en de bemesting zijn periodiek herhaald, afhankelijk van de weersomstandigheden en de snelheid van het afbraakproces.

Het resultaat van deze biologische reinigingstechniek zal worden beoordeeld aan de hand van de afname van het oliegehalte in frequent (1 keer per 2 a 4 weken) genomen grondmonsters. De behandeling van de grond wordt beeindigd zodra het oliegehalte is gedaald tot beneden de van overheidswege gestelde normen.

De uitspoeling van oliekomponenten en/of afbraakprodukten is onderzocht door het drainwater regelmatig te bemonsteren en te analyseren.

Emissie van vluchtige komponenten naar de atmosfeer is niet in het onderzoek opgenomen. Op laboratoriumschaal is wel onderzocht in hoeverre vervluchtiging een rol speelt bij de afbraak van verschillende oliesoorten.

Het hier beschreven onderzoek naar biologische reiniging van vervuilde grond op praktijkschaal sluit aan op eerder onderzoek in het laboratorium, waarbij het effekt van bemesting op de afbraak van olie is onderzocht. Bemesting bleek zodanig stimulerend te werken dat onder optimale omstandigheden de afbraak soms een faktor 10 sneller verliep. Daarbij bleek ook dat grondbewerking afgezien van een gunstig effekt op de bodemaeratie, ook een herverdeling van de olie in de grond tot gevolg heeft waardoor de kans op uitspoeling van olieprodukten afneemt.

Onder optimale omstandigheden bij 20 C bleek de halfwaardetijd voor huisbrandolie ca. 130 dagen te bedragen. Gezien de lage temperaturen in de winterperiode mag worden verwacht dat onder veldomstandigheden naar schatting 50-75% van de aanwezige olie wordt afgebroken in een tijdsbestek van een jaar.

Het laboratoriumonderzoek heeft uitgewezen dat de afbraak van olieprodukten gepaard gaat met uitspoeling van afbraakprodukten. Aan de hand van UV-spektra is gebleken dat het waarschijnlijk stoffen betreft, die ook van nature in grond voorkomen (mogelijk humusachtigeverbindingen). Identifikatie van individuele komponenten heeft echter niet plaatsgevonden.

Voor de resultaten van dit projekt wordt verwezen naar de betreffende ICW-nota (nog in voorbereiding).

bijlage 2: gebruikte chemikaliën

Ammoniumnitraat : Merck 99% zuiver
Diwaterstofkaliumfosfaat : J.T.Baker Chemicals 98,8% zuiver
Waterstofdikaliumfosfaat : J.T.Baker Chemicals 98,8% zuiver
Calciumcarbonaat : Merck 99% zuiver
Natronkalk met indikator : Lamers & Pleuger
n-Hexaan : Lamers & Pleuger (C_6H_{14}) chemisch zuiver
Naftaleen : J.T.Baker Chemicals ($C_{10}H_8$)
Anthraceen : J.T.Baker Chemicals ($C_{14}H_{10}$)
Fluorantheen : J.T.Baker Chemicals ($C_{15}H_9$)
Acetonitril : J.T.Baker Chemicals (
Spore-elementen: oplossing in voorraad bij Vakgroep Mikrobiologie LHW.
Benzeen : J.T.Baker Chemicals (C_6H_6)
Tolueen : J.T.Baker Chemicals ($C_6H_5CH_3$)
o-Xyleen : J.T.Baker Chemicals ($C_6H_4(CH_3)_2$)
n-Hexadecaan : J.T.Baker Chemicals ($CH_3(CH_2)_{14}CH_3$

Bijlage 3: Analysemethoden

De pH van de grond is gemeten door 20 gram grond gedurende 2 uur te schudden met 50 ml demiwater. Daarna is het water gefilterd door een papieren vouwfilter in een trechter. Het water is geroerd met een roervlo gedurende 3 minuten en daarna is de pH afgelezen.
De pH van water is gemeten op dezelfde wijze als is beschreven voor het waterextrakt van de grond.
Er is gebruik gemaakt van een Philips digital pH meter PW 9408 type A213 met temperatuurkorrektie.

Het vochtgehalte van de grond is bepaald door de verse grond te wegen met een bovenweger en vervolgens te drogen in een stoof bij 120° C. Daarna werd de droge grond weer gewogen. De gewichtvermindering is de hoeveelheid water in de verse grond geweest.

Het TOC-gehalte is gemeten in het waterextrakt van de grond (zie pH-bepaling) en in het medium van de naftaleensplitsende bakterie, dat voor de meting m.b.v. centrifugeren bij 3000 rpm werd ontdaan van cellen en vast naftaleen. Het waterextrakt van de grond werd voor de meting gefilterd over 0,45 um.
M.b.v. een standaardoplossing met 1000 ppm organisch C werden een aantal verdunningen gemaakt voor het maken van een ijklijn.
De monsters en de ijk-verdunningen werden gedurende 2 minuten doorgeleid met N_2 om opgeloste CO_2 te verwijderen. Direkt daarna werd 20 ul in de Beckman TOC Analyzer Model 915A ingespoten. De waarden zijn geregistreerd m.b.v. een schrijver. Aan de hand van de verkregen pieklengten is het TOC-gehalte berekend.

De zuurstofkonsentraties onderin de potten is gemeten door 35 ml bodemlucht door een zuurstofmeter op te zuigen en daarin het zuurstofgehalte te meten m.b.v. een zuurstofmeter met een schaal van 0-21 % zuurstof. Na aflezen werd de lucht weer in de pot teruggebracht.

Het nitraatgehalte in het waterextrakt van de grond is gemeten door een medewerker van het ICW met behulp van HPLC, volgens door het ICW ontwikkelde methode.

De ammoniumkonsentratie is fotometrisch bepaald volgens NEN 3235-6.1.1.

De fosfaatkonsentratie is fotometrisch bepaald vogens NEN 3235-8.2.

De olieanalyses in grond zijn bepaald via een hexaanextrakt van de grond dat bereid is op de hier beschreven manier.

- Breng 50 g. niet gedroogde grond in de papieren huls van een Soxleth en sluit deze af met een wattenprop.
- Doe de kolf van de Soxleth bijna vol met zeer zuivere n-hexaan + een paar kooksteentjes.
- Sluit alles op de voorgeschreven wijze aan en doe de kraan voor de koeler aan.
- Schakel de thermostaat van het verwarmingselement aan.
- Doe na 7 uur de thermostaat uit en laat de Soxleth afkoelen.
- Doe na ± 5 min. ook de kraan van de koeler dicht.
- De volgende dag wordt het HBO-extrakt gezuiverd door leiden over een kolommetje met 1 schepje Na_2SO_4 (watervrij) en Florisyl; het crude-oil-extrakt wordt niet gezuiverd en gedroogd.
- Breng vervolgend het extrakt over in een Kuderna-Dänisch apparaat en damp op een waterbad in tot ca. 5 ml. Weeg vooraf het droge puntbuisje met daarin een kooksteentje.
- Plaats het puntbuisje met het extrakt in heet water en damp verder in met stikstofgas tot 1 à 1,5 ml. Bepaal dit volume door weging (s.g. hexaan is ± 0,66)
- Spuit 3 of 5 ul van het extrakt in de gaschromatograaf.

De HBO-analyses werden verricht met een Packard Becker 417 gaschromatograaf met FID. De crude-analyses zijn uitgevoerd met een GC system 8200 met FID. De gaschromatografen waren aangesloten op een integrator (Vista) en de piekoppervlakken zijn vergeleken met die van standaard-oplossingen HBO en crude-oil in hexaan.

Bepaling naftaleen in sapromatvaatjes met water.

- Leeg het sapromatvaatje in een scheidtrechter met teflonkraan van 300 ml.
- Breng 100 ml zeer zuivere n-hexaan in het sapromatvaatje en spoel het vaatje hiermee goed; breng de hexaan ook in de scheidtrechter.
- Schud ca. 3 min. en laat ± 15 min. ontmengen. Indien er schuimvorming optreedt, voeg dan een schepje NaCl toe.(Indien dit de schuimvorming niet weghaalt, centrifugeer dan in glazen centrifugeerbuizen gedurende 15 min (3000 rpm) en pipeteer de hexaanfase af.)
- Tap de hexaanfraktie af en herhaal deze procedure nog 2 maal.
- Verzamel de hexaanfraktie in een glazen erlenmeyer met glazen stop.
- Leidt het extrakt over een kolommetje met Na_2SO_4 (watervrij) om alle water te verwijderen.
- Breng het extrakt over in een Kuderna-Dänisch apparaat en damp in op een waterbad tot ± 5 ml. Weeg vooraf het droge puntbuisje met daarin een kooksteentje.
- Plaats het puntbuisje met het extrakt in heet water en damp alle hexaan af door overleiden met N_2-gas.
- Laat de geëxtraheerde naftaleen - afhankelijk van de (zichtbare) hoeveelheid - opnemen in 1-5 ml acetonitril, bepaal dit volume door weging.
- Los 100 ul van het acetonitrilextrakt op in 100 ml zeer zuiver water en schud goed. Er wordt zo een oplossing van naftaleen in water verkregen die onder de oplosbaarheid van naftaleen in water ligt, maar die m.b.v. een HPLC nog steeds goed kwantitatief te bepalen is.)
- Spuit 200 ul van de naftaleenoplossing in water in de HPLC.

Instelling van de HPLC.
Zie analyse van afbraakprodukten van naftaleen in water.

- Het piekoppervlak wordt gemeten m.b.v. een integrator (Vista).
- Het piekoppervlak wordt vergeleken met die van standaardoplossingen, die bekende hoeveelheden naftaleen in water bevatten.

Afbraakproduktenanalyse m.b.v. HPLC

- 5 ml van het geroerde minerale medium werd m.b.v. een pipet overgebracht in glazen centrifugebuizen en gecentrifugeerd gedurende 20 minuten bij 3000 rpm.
- de supernatant werd met een schone pipet overgebracht in glazen 7 ml vaatjes en afgesloten met een plastic dopje .
- direkt daarop werd 200 ul geïnjekteerd op de kolom (RP 18 Lichosorb)

omstandigheden HPLC:

flow: 1,5 ml/min

0-5 min: 100 % water (zeer zuiver water werd op het lab bereid)

5-30 min: gradiënt naar 100 % acetonitril

30-35 min: 100 % acetonitril

35-40 min: gradiënt terug naar 100 % water

Detektie: 254 nm (UV)

Bandwidth: 8 nm

Attentuator: 64

- injektie schakelen: time 0 evnt 0
  time 0,1 evnt 4
  time 3 evnt 0

Programma HPLC:

time	code	value
0	flow	1,5
0	%	0
0	RSVR	BC
0	EVNT	0
0,1	EVNT	4
0,1	EVNT	5
3	EVNT	0
5	%	0
30	%	100
35	%	100
40	%	0
50	prgm	1

Altijd het eind en het begin van een stap aangeven.

De door de detektor geregistreerde komponenten werden opgenomen m.b.v. een schrijver en in het geheugen van een komputer, de VISTA, die het verkregen piekoppervalk integreerde.
Het programma van de VISTA is als volgt:

```
SINGLE CHANNEL METHOD: NAFT                    18:49   8 APR 86

SECTION 1: BASIC
PAGE 1
  ANALYSIS PARAMETERS
  CHANNEL: 1
  CALCULATION: A%
  AREA/HT: A
  STOP TIME:  40.00
  NUMB EXPECTED PKS:  100
  EQUILIBRATION TIME:  0
  UNRETAINED PK TIME:  0.00
  UNIDENT PK FACTOR: 0.000000
  SLICE WIDTH:  10

PAGE 2
  SAMPLE PARAMETERS
  RUN TYPE: A
  SAMPLE ID: SAPROMAT011
  DIVISOR: 1.000000
  AMT STD: 1.000000
  MLTPLR: 1.000000

PAGE 3
  REPORT INSTRUCTIONS
  WHERE TO REPORT: L
  COPIES: 1
  TITLE: NAFTALEEN IN WATER
  FORMAT: E
  DECIMAL PLACE: 4
  RESULT UNITS: MG/L
  REPORT UNIDENT PKS: Y
  REPORT INSTRUMENT CONDITIONS: N

PAGE 4
  PLOT INSTRUCTIONS
  PLOT: N
  ZERO OFFSET: 10
  ANNOTATION
    RETENTION TIME: Y
    PLOT CONTROL: Y
    TIME TICKS: Y
    TIME EVENTS: N
    PK START/END: N

PAGE 5
  CHART SPEED
    PAGES OR CM/MIN: C
    INIT VALUE:  0.6
```

```
PAGE 6
  PLOT ATTEN
    INIT PLOT ATTEN: 4


SECTION 2: TIME EVENTS
PAGE 1
   LINE#  TIME  EVENT   VALUE
   1       0.00  PR        100
   2       0.00  SN          2
   3       0.00  T%        5.0
   4       0.00  WI         (40) 20


SECTION 3: PEAK TABLE
PAGE 1
  STD PK#:  0
  RELATIVE RETEN PK#:  0
  RESOLUTION PK#:  0
  RESOLUTION MINIMUM:   0.0
  FACT%:   5.0
  IDENTIFICATION TIME WINDOWS +/-
  REF
    %: 10
    MIN:   0.00
  NON REF
    %:  5
    MIN:   0.00

PAGE 2

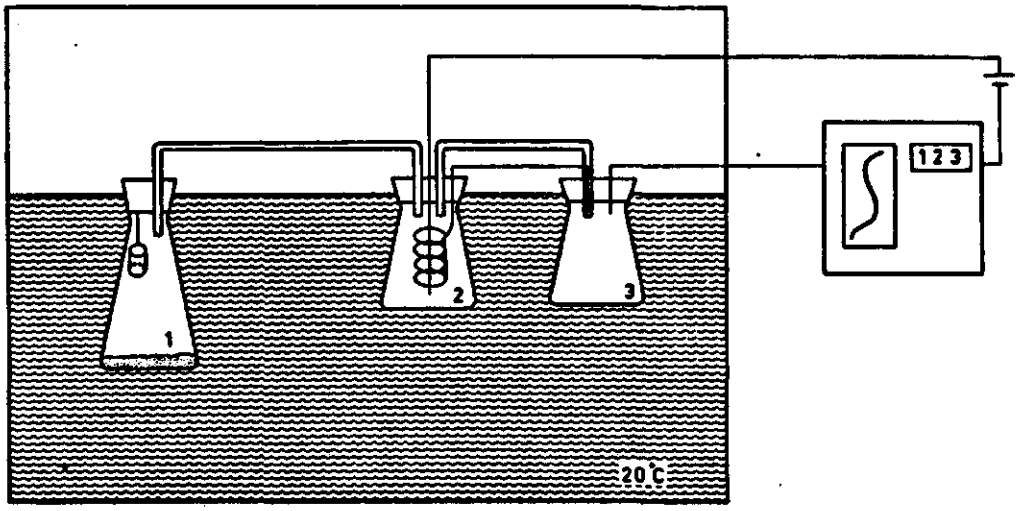

SECTION 7: POST RUN
PAGE 1
  FILE NAME: SAPROMAT
  SAVE INSTRUCTIONS
    TYPE: RAW
    WHERE TO SAVE: U
  TRANSMIT/REPLOT INSTRUCTIONS
    TRANSMIT RAW DATA: N
    REPLOT WITH BASELINES: Y
    RAW DATA LOCATION: U
    TRANSMIT REPORT: N

PAGE 2
  METHOD LINKING INSTRUCTIONS
    METHOD:
    LINK CALC RESULTS: N
  PROGRAM EXECUTION
    PROGRAM:
    PARAMETERS:
    RESERVE PRINTER: Y


SECTION 10: NOTE PAD
PAGE 1
   LINE#        VALUE
   1       HPLC FLOW 1,5 ML/MIN ,0-5 MIN 100% WATER
   2       5-30 MIN GRADIENT NAAR 100% ACETONITRIL
   3       30-35 MIN 100% ACETONITRIL 35-40 MIN
   4       TERUG NAAR 100% WATER
   5       DETECTIE UV 254 NM,8 NM BANDWIDTH
   6       INJECTIE 200 MICROLITER
```

bijlage 4: Werking en inrichting van de sapromat

De Sapromat is in de eerste plaats ontwikkeld als instrument voor de bepaling van BOD in watermonsters. Het werd in deze proef gebruikt om de zuurstofkonsumptie in een hoeveelheid grond te bepalen. In onderstaande figuur is schematisch weergegeven uit welke onderdelen de Sapromat is opgebouwd.



In een op 20°C gehouden waterbad zijn drie van de buitenlucht afgesloten vaten aangebracht, die door middel van slangen in open verbinding met elkaar staan.

In vat 1 wordt een afgewogen hoeveelheid grond gebracht. Het vaatje dat aan de stop is bevestigd, wordt gevuld met natronkalk met indikator, die aangeeft wanneer het natronkalk verzadigd is met koolzuur.

Vat 2 bevat een oplossing van kopersulfaat waarin twee elektroden steken. Een van de twee elketroden staat in kontakt met vat 3 waarin een zoutoplossing is gebracht. In deze zoutoplossing steekt nog een tweede elektrode die verbonden is met een recorder.

De hier gebruikte Sapromat bevat 6 eenheden van deze drie vaten. Alle zes eenheden zijn op dezelfde recorder aangesloten die simultaan zowel cijfermatig als grafisch het verloop van de zuurstofkonsumptie in de zes eenheden kan registreren.

Het principe van de Sapromat is als volgt:
In vat 1 wordt bij de afbraak van organisch materiaal door bakteriën

zuurstof verbruikt en kooldioxyde afgegeven aan de omgeving. Doordat de koolzuur door de natronkalk wordt geadsorbeerd zal er een onderdruk ontstaan, niet alleen in vat 1 maar ook in de andere vaten.
In vat 3 zorgt de onderdruk voor het stijgen van het vloeistofniveau in de buis die in de oplossing steekt. Zodra de elektrode, die zich in die buis bevindt, in aanraking komt met de zoutoplossing, kan er een stroom gaan lopen. Door deze stroom vindt er elektrolyse plaats in de kopersulfaat oplossing in vat 2, waarbij zuurstof wordt ontwikkeld volgens:

$$2\ Cu^{++} + 4e \rightarrow 2\ Cu$$
$$2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e$$
$$\overline{2\ Cu^{++} + 2H_2O \rightarrow 2Cu + O_2 + 4H^+}$$

zodoende wordt voortdurend de gekonsumeerde zuurstof aangevuld met verse zuurstof en blijven de omstandigheden gedurende de proef gelijk. De stroom die de elektrolyse veroorzaakt, wordt gemeten, omgerekend naar mg O_2 per liter en getalsmatig en grafisch weergegeven op de recorder.
Bij grond in de vaatjes werd omgerekend van mg O_2 per liter naar mg O_2 per vaatje
Bij de met grond uitgevoerde experimenten werd 100 gram grond per vaatje gebruikt.
Bij de experimenten met het geïsoleerde mikro-organisme werd in plaats van grond 100 ml mineraal medium, 1 gram naftaleen (balans) en inoculum per vaatje gebruikt, en een grote roervlo ($\pm$ 7 cm). Tijdens de experimenten met zuurstofgebrek was een veel kleinere roervlo gebruikt ($\pm$ 2 cm).

Notities