

NOBIS 96-1-08

**BIODEGRADATIE VAN
MICROVERONTREINIGINGEN
MET SCHIMMELTECHNOLOGIE**

drs. J. Harmsen
A. van den Toorn
ir. D. Riedstra
ir. J.A.N.M. Heersche
W.A. Traag
T. Zuidema
dr. H.J.M. op den Camp
dr. A. Pol
prof. dr. L.J.L.D. van Griensven
drs. J.P.G. Gerrits
ing. L.A. van der Kooij

oktober 1998

Gouda, CUR/NOBIS

Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-Situ Sanering

Auteursrechten

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of op enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van CUR/NOBIS. Het is toegestaan overeenkomstig artikel 15a Auteurswet 1912 gegevens uit deze uitgave te citeren in artikelen, scripties en boeken, mits de bron op duidelijke wijze wordt vermeld, alsmede de aanduiding van de maker, indien deze in de bron voorkomt, "©" Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie", oktober 1998, CUR/NOBIS, Gouda."

Aansprakelijkheid

CUR/NOBIS en degenen die aan deze publicatie hebben meegewerkt, hebben een zo groot mogelijke zorgvuldigheid betracht bij het samenstellen van deze uitgave. Nochtans moet de mogelijkheid niet worden uitgesloten dat er toch fouten en onvolledigheden in deze uitgave voorkomen. Ieder gebruik van deze uitgave en gegevens daaruit is geheel voor eigen risico van de gebruiker en CUR/NOBIS sluit, mede ten behoeve van al degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt, iedere aansprakelijkheid uit voor schade die mocht voortvloeien uit het gebruik van deze uitgave en de daarin opgenomen gegevens, tenzij de schade mocht voortvloeien uit opzet of grove schuld zijdens CUR/NOBIS en/of degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt.

Copyrights

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording and/or otherwise, without the prior written permission of CUR/NOBIS. It is allowed, in accordance with article 15a Netherlands Copyright Act 1912, to quote data from this publication in order to be used in articles, essays and books, on condition that the source of the quotation, and, insofar as this has been published, the name of the author, are clearly mentioned, "©" Biodegradation of micro pollutants with fungi", October 1998, CUR/NOBIS, Gouda The Netherlands."

Liability

CUR/NOBIS and all contributors to this publication have taken every possible care during the preparation of this publication. However, it can not be guaranteed that is publication is complete and/or free of faults. The use of this publication and data from this publication is entirely for the user's own risk and CUR/NOBIS hereby excludes any and all liability for any and all damage which may result from the use of this publication or data from this publication, except in so far as this damage is a result of intentional fault or gross negligence of CUR/NOBIS and/or the contributors.

Titel rapport

Biodegradatie van microverontreinigingen
met schimmeltechnologie

CUR/NOBIS-rapportnummer

96-1-08

Projectrapportnummer

96-1-08

Spoor 1: Biodegradatie van
PAK en minerale olie

Spoor 2: Biodegradatie van
PCB's, HCH, DDT en
dioxinen

Auteurs

drs. J. Harmsen
A. van den Toorn
ir. D. Riedstra
ir. J.A.N.M. Heersche
W.A. Traag
T. Zuidema
dr. H.J.M. op den Camp
dr. A. Pol
prof. dr. L.J.L.D. van Griensven
drs. J.P.G. Gerrits
ing. L.A. van der Kooij

Aantal bladzijden

Rapport: 64

Bijlage: 38

Uitvoerende organisaties

DLO-Staringcentrum	(drs. J. Harmsen, tel. 0317-474360)
Proefstation voor de Champignoncultuur	(prof. dr. L.J.L.D. van Griensven, tel. 077-4647575)
BION Overijssel	(ir. J.A.N.M. Heersche, tel. 0546-577919)
RIKILT-DLO	(W.A. Traag, tel. 0317-475400)
AKZO NOBEL Chemicals	(ir. J.J. Damen, tel. 074-2443459)
AKZO NOBEL Organon Teknika	(ir. J. Derks, tel. 0411-654240)
RIZA	(dr. M. Ferdinandy-van Vlerken, tel. 0320-298411)
Rijkswaterstaat Noord-Holland	(ir. V. Schaap, tel. 023-5301301)
Gemeente Hengelo	(ir. H.C.J. Meijvis, tel. 074-2459876)
GOBZH	(ir. de Haan, tel. 0182-625500)
DHV Milieu en Infrastructuur	(ing. L.A. van der Kooij, tel. 033-4682933)

Uitgever

CUR/NOBIS, Gouda

Samenvatting

Het hoofddoel van het uitgevoerde project is de toepassing van schimmels voor de reiniging van met PAK, minerale olie, PCB's, DDT, HCH en dioxinen verontreinigde grond en baggerspecie te optimaliseren en verbreden. Vanwege het grote belang dat wordt gehecht aan economisch haalbare technieken, is gekozen voor gebruik van residuele substraten van schimmels die commercieel worden geteeld in Nederland: de champignon (*Agaricus bisporus*) en de oesterzwam (*Pleurotus*). Literatuuronderzoek heeft uitgewezen dat deze schimmels hiervoor geschikt zouden zijn vanwege hun enzymstelsel.

Experimenten hebben aangetoond dat met gebruik van deze schimmels afbraak van PAK en olie mogelijk is. Deze afbraak is echter niet toe te schrijven aan de activiteit van de schimmels, maar aan de activiteit van andere micro-organismen die worden gestimuleerd of ingebracht door de substraten (compost) en de daarin aanwezig meststoffen. Gebruik van compost uit de commerciële schimmelteelt kan voor PAK en minerale olie leiden tot betere resultaten in de biologische on-site- of in-doorgrondreiniging. Ondanks de hoge mate van biologische activiteit onder optimale omstandigheden is noch met compost met de actieve schimmels *Agaricus bisporus* en *Pleurotus* noch met gestoomde compostafbraak van DDT, HCH, PCB's of dioxinen aangetoond.

Trefwoorden

Gecontroleerde termen:

baggerspecie, compost, DDT, heterocyclische oesterzwam, dioxines, HCH, grondreiniging, minerale olie

Vrije trefwoorden:

champost, champignon, dioxines, HCH, grondreiniging, minerale olie

Titel project

Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie

Projectleiding

DHV Milieu & Infrastructuur
(ing. L.A. van der Kooij,
033 - 4682933)

Dit rapport is verkrijgbaar bij:
CUR/NOBIS, Postbus 420, 2800 AK Gouda

Report title

Biodegradation of micro pollutants
with fungi

CUR/NOBIS report number

96-1-08

Project report number

96-1-08

Track 1: Biodegradation of PCAH
and mineral oil

Track 2: Biodegradation of PCB's,
HCH, DDT and dioxinen

Authors

drs. J. Harmsen
A. van den Toorn
ir. D. Riedstra
ir. J.A.N.M. Heersche
W.A. Traag
T. Zuidema
dr. H.J.M. op den Camp
dr. A. Pol
prof. dr. L.J.L.D. van Griensven
drs. J.P.G. Gerrits
ing. L.A. van der Kooij

Number of pages

Report: 64

Appendice: 38

Executive organisations

DLO-Staringcentrum	(drs. J. Harmsen, phone 0317-474360)
Proefstation voor de Champignoncultuur	(prof. dr. L.J.L.D. van Griensven, phone 077-4647575)
BION Overijssel	(ir. J.A.N.M. Heersche, phone 0546-577919)
RIKILT-DLO	(W.A. Traag, phone 0317-475400)
AKZO NOBEL Chemicals	(ir. J.J. Damen, phone 074-2443459)
AKZO NOBEL Organon Teknika	(ir. J. Derks, phone 0411-654240)
RIZA	(dr. M. Ferdinandy-van Vlerken, phone 0320-298411)
Rijkswaterstaat Noord-Holland	(ir. V. Schaap, phone 023-5301301)
Gemeente Hengelo	(ir. H.C.J. Meijvis, phone 074-2459876)
GOBZH	(ir. de Haan, phone 0182-625500)
DHV Milieu en Infrastructuur	(ing. L.A. van der Kooij, phone 033-4682933)

Publisher

CUR/NOBIS, Gouda

Abstract

The main goal of this project is the optimization and broadening of the use of fungi for the remediation of soils and sediments contaminated with PCAH, mineral oil, PCB, DDT, HCH and dioxins. Because of the economic interest spent mushroom substrate from commercial Dutch cultures has been chosen, i.e. the mushroom *Agaricus bisporus* and the oyster mushroom *Pleurotus*. Searches in literature indicate that these fungi because of their enzymatic systems would be suited for the extracellulair degradation of complex structures.

Experiments on pilot scale showed that with the use of spent substrate from mushrooms and oyster mushrooms the degradation of PCAH and mineral oil is possible. However the degradation is not due to the enzymatic activity of the grafted fungi but to the activity of other micro organisms that are stimulated by the substrates and the fertilizers within them. This means that the use of spent substrate from the commercial cultures can lead to better results in the biological on site and indoor remediation of soils and sediments contaminated with mineral oil and PCAH. In spite of the large microbial activity neither with active spent compost from mushroom or oyster mushroom cultures nor with pasteurated spent compost any degradation of DDT, HCH, PCB or dioxins has been reached.

Keywords

Controlled terms

dredging spoil, compost, DDT, heterocyclic, compounds, landfarming, mushrooms, PCAH, PCB, fungi

Uncontrolled terms:

spent mushrooms substrate, oyster mushrooms, dioxins, HCH, soil remediation, mineral oil

Project title

Biodegradation of micro pollutants with fungi

Projectmanagement

DHV Milieu & Infrastructuur B.V.
(ing. L.A. van der Kooij
033 - 4682933)

This report can be obtained at:
CUR/NOBIS, PO Box 420, 2800 AK Gouda, The Netherlands
Dutch Research Programme In-Situ Bioremediation (NOBIS)

VOORWOORD

Het NOBIS-project *Biodegradatie van microverontreinigingen met behulp van schimmeltechnologie* is uitgevoerd door een consortium waarin de volgende organisaties deelnemen:

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

DHV is penvoerder van het consortium, dat is gesponsord door:

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

Het laboratoriumonderzoek is in twee parallelle sporen uitgevoerd door DLO-Staringcentrum, BION Overijssel BV, de vakgroep Microbiologie & Evolutiebiologie (KU Nijmegen), het Proefstation voor de Champignoncultuur en het Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwproducten (RIKILT-DLO). In het schema op de volgende pagina staat de opzet van het totale project *Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie*. Het project is voor beide sporen na fase 1 beëindigd omdat de go-no-go-criteria niet konden worden gehaald.

<i>Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie</i>			
Spoor 1 Olie en PAK		Spoor 2 PCB's, HCH, DDT en dioxinen	
Fase 1 Pilotonderzoek en toetsing		Fase 1 Oriëntatie en selectie schimmels	
1 a	Pilotonderzoek: - Tunnelproeven - Halproeven - Landfarmproeven	1a	Literatuuronderzoek Bepaling van analysemethoden
1 b	Toetsing aan andere biologische Technieken	1b	Laboratoriumonderzoek: - Biologisch - Chemisch-analytisch
Fase 2 Praktijkproeven: - Tunnelproeven - Halproeven - Landfarmproeven		Fase 2 Pilotonderzoek: - Tunnelproeven - Halproeven - Landfarmproeven	
		Fase 3 Praktijkproeven	
		Fase 3 Evaluatie	
		3a	Opschalings- en uitvoeringsaspecten
		3b	Eindrapportage

INHOUD

	SAMENVATTING.....	ix
	CONCLUSIES.....	xv
	SUMMARY.....	xvii
	CONCLUSIONS.....	xxi
Spoor 1	<i>TOEPASSINGSMOGELIJKHEDEN VAN SCHIMMELS UIT DE CHAMPIGNONTEELT BIJ DE REINIGING VAN MET PAK EN MINERALE OLIE VERONTREINIGDE BAGGERSPECIE EN GROND</i>	1
	SAMENVATTING	3
Hoofdstuk 1	INLEIDING.....	5
Hoofdstuk 2	ENZYMSYSTEMEN VAN SCHIMMELS.....	7
Hoofdstuk 3	BIOLOGISCHE AFBRAAK VAN PAK IN PETROLEUMHAVEN-SPECIE.....	9
Hoofdstuk 4	TOEPASSINGSUITGANGSPUNTEN BIJ DE REINIGING VAN BAGGERSPECIE MET SCHIMMELS	13
Hoofdstuk 5	UITGEVOERD ONDERZOEK.....	17
	5.1 Biodegradatie in tunnels.....	17
	5.2 Terrariumproeven met Petroleumhaven-specie	19
	5.3 Toepassing van schimmeltechnologie onder praktijkomstandigheden in de buitenlucht	20
	5.4 Terrariumproeven met verse baggerspecie en grond van een gasfabrieksterrein.....	22
Hoofdstuk 6	RESULTATEN EN DISCUSSIE.....	23
	6.1 Biodegradatie in tunnels.....	23
	6.2 Terrariumproeven met Petroleumhaven-specie	24
	6.3 Praktijkomstandigheden in de buitenlucht.....	25
	6.4 Terrariumproeven met verse baggerspecie en grond van een gasfabrieksterrein.....	30
Hoofdstuk 7	CONCLUSIES	35
	7.1 Activiteit van de toegevoegde schimmel	35
	7.2 Afbraak van PAK en minerale olie.....	36
Spoor 2	<i>PCB'S, HCH, DDT EN DIOXINEN, FASE 1B: LABORATORIUMONDERZOEK</i>	37
	SAMENVATTING	39
Hoofdstuk 8	INLEIDING.....	41
	8.1 Metingen van enzymactiviteiten	41
	8.2 Bepaling respiratiesnelheden en optimalisering van incubaties	41
	8.3 Incubaties onder optimale condities gedurende twee maanden	42
Hoofdstuk 9	UITVOERING	43
	9.1 Bereiding van mengsels (uitgevoerd door het proefstation).....	43
	9.2 Bepaling metabole activiteit.....	43
	9.3 Meting van enzymactiviteiten	43
	9.4 Opstelling voor de incubatie gedurende twee maanden	44
	9.5 Bepaling van het gehalte aan gechloreerde verbindingen.....	44

Hoofdstuk 10	RESULTATEN	49
	10.1 Droge-stofanalyses.....	49
	10.2 Bepaling van de metabole activiteit.....	50
	10.3 Invloed van vochtgehalte op de metabole activiteit.....	51
	10.4 Meting van enzymactiviteiten	52
	10.5 Incubatie van de mengsels gedurende twee maanden	52
	10.6 CO ₂ -productie van de kolommen.....	53
	10.7 Laccase-activiteit in de kolommen.....	54
	10.8 Organische-stofanalyse van de inhoud van de kolommen.....	54
	10.9 Gehalte aan organische microverontreinigingen	54
Hoofdstuk 11	CONCLUSIES	59
Hoofdstuk 12	AANBEVELINGEN	61
	LITERATUUR	63

Bijlage A *TOEPASSINGSMOGELIJKHEDEN VAN (WIT-ROT) SCHIMMELS BIJ BODEMREINIGING. EEN LITERATUURSTUDIE, DOOR DR. R. DIJKERMAN, DR. H.J.M. OP DEN CAMP, DR.C. VAN DER DRIFT EN PROF. DR. L.J.L.D. VAN GRIENSVEN*

SAMENVATTING

Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie

Aanleiding

Veel verontreinigingen in de bodem kunnen met bacteriën worden afgebroken. Bekende voorbeelden zijn vluchtige organische verbindingen, monocyclische aromaten en enkele polyclische aromaten. Bodemverontreinigingen bestaan echter ook uit complexere verbindingen, waaronder polyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's), polychloorbifenylen (PCB's), DDT, hexachloorcyclohexaan (HCH) en dioxinen. Deze verbindingen kunnen zowel in de bodem als in de waterbodem/baggerspecie voorkomen. De bacteriële afbraakprocessen verlopen voor deze complexe verbindingen aanzienlijk langzamer dan voor minder complexe verbindingen. Deze tegenvallende afbraak kan meerdere oorzaken hebben, zoals de ontoegankelijkheid van verontreinigingen voor bacteriën vanwege sterke adsorptie of molecuulgrootte of het ontbreken van de juiste omstandigheden om bacteriële afbraak mogelijk te maken. Zo zijn PAK's met vier of meer ringen, evenals PCB's met vier of meer chlooratomen, resistent tegen bacteriële degradatie.

Witrotschimmels zijn in staat om met hun extracellulaire ligninolytische enzymen lignine af te breken. Deze lignine-afbraak verloopt via niet-specifieke radicaalreacties, waardoor ook andere complexe verbindingen worden afgebroken. Het gevolg is dan ook dat veel van de bovengenoemde verontreinigingen in principe kunnen worden afgebroken door deze enzymen vanwege de structurele overeenkomst ervan met onderdelen van lignine.

Literatuuronderzoek heeft uitgewezen dat schimmels met een hoge mate van ligninolytische enzymactiviteit, zoals *Phanerochaete chrysosporium* en *Beijerkandera Boss 55*, in staat zijn om een aantal verontreinigingen onder geconditioneerde en gecontroleerde omstandigheden in het laboratorium af te breken. Met dit onderzoek in het kader van het Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Saneringen (NOBIS) is beoogd deze mechanismen te gebruiken om de afbraak van PAK, PCB's, DDT, HCH en dioxinen te versnellen.

Doel onderzoek

Het hoofddoel van het onderzoek is het optimaliseren en verbreden van de toepassing van schimmels voor kosteneffectieve reiniging van met persistente cyclische koolwaterstoffen verontreinigde grond en baggerspecie. Als persistente verontreinigingen zijn gekozen PAK, minerale olie, PCB's, DDT, HCH en dioxinen. Er is een aanpak in twee parallel lopende sporen gevolgd:

1. *Spoor 1*: toetsing, optimalisering en opschaling van de techniek van het gebruik van schimmels in vergelijking tot andere biologische technieken om PAK en minerale olie af te breken.
2. *Spoor 2*: ontwikkelen van toepassingen om met schimmels PCB's, DDT, HCH en dioxinen af te breken.

Schimmelkeuze

Vanwege het grote belang dat wordt gehecht aan economisch haalbare technieken, is gekozen voor gebruik van residuele substraten van schimmels die commercieel worden geteeld in Nederland. Dit zijn de champignon (*Agaricus bisporus*) en de oesterzwam (*Pleurotus spp.*). Het teeltresidu van de championenteelt wordt aangeduid met 'champost'. Gebruik van deze residuen in de biologische bodemsanering creëert een potentiële win-winsituatie:

- hergebruik van een afvalstof;
- sanering van de bodem;
- verlaging van kosten.

Literatuuronderzoek heeft uitgewezen dat *Agaricus bisporus* en *Pleurotus* ligninolytische enzymen hebben, zij het dat de activiteit daarvan minder is dan van *Phanerochaete chrysosporium* en *Bjerkandera Boss 55*. Gebruik van de laatstgenoemde schimmels is technisch mogelijk maar is op voorhand economisch niet haalbaar vanwege de hoge kweekkosten.

Spoor 1: PAK en minerale olie

Aanpak

Spoor 1 is begonnen met een serie benchscale-experimenten, waarbij gebruik is gemaakt van de kennis uit de literatuur en de ervaringen van individuele consortiumleden met landfarming, biologische grondreiniging en schimmeltechnieken. Voor de experimenten is gebruikgemaakt van langdurig gelandfarmde baggerspecie uit de ernstig met olie en PAK verontreinigde Petroleumhaven van Amsterdam. Juist deze specie is gekozen omdat daarop veel biologische reinigingstechnieken zijn getest en omdat is aangetoond dat deze leiden tot afbraak van PAK en olie. Door gebruik te maken van de nog in zekere mate verontreinigde specie die na de landfarming is overgebleven (PAK-gehalte circa 40 mg/kg, minerale oliegehalte circa 3.000 mg/kg), kan worden vastgesteld of gebruik van schimmels leidt tot een afbraak die verdergaat waar andere biologische technieken stagneren. Verschillende omstandigheden zijn getest met deze gelandfarmde specie. Aanvullende experimenten zijn uitgevoerd met grond van een voormalig gasfabrieksterrein en verse baggerspecie uit een watergang in de buurt van een voormalige cokesfabriek. Deze experimenten waren gericht op:

1. bepalen van de effectiviteit van champignonsubstraat (als verse compost en als champost) en vers en gebruikt *Pleurotus*-substraat in verschillende doseringen;
2. bepalen van optimale omstandigheden voor de afbraak door schimmels (tunnels, indoor-landfarming, landfarming in de open lucht, laagdikte);
3. bepalen van de gevolgen van structuurverandering van de grond/specie door de toediening van substraat in de vorm van compost;
4. bepalen van de gevolgen van het toedienen van een breed spectrum aan biomassa.

De volgende experimenten zijn uitgevoerd:

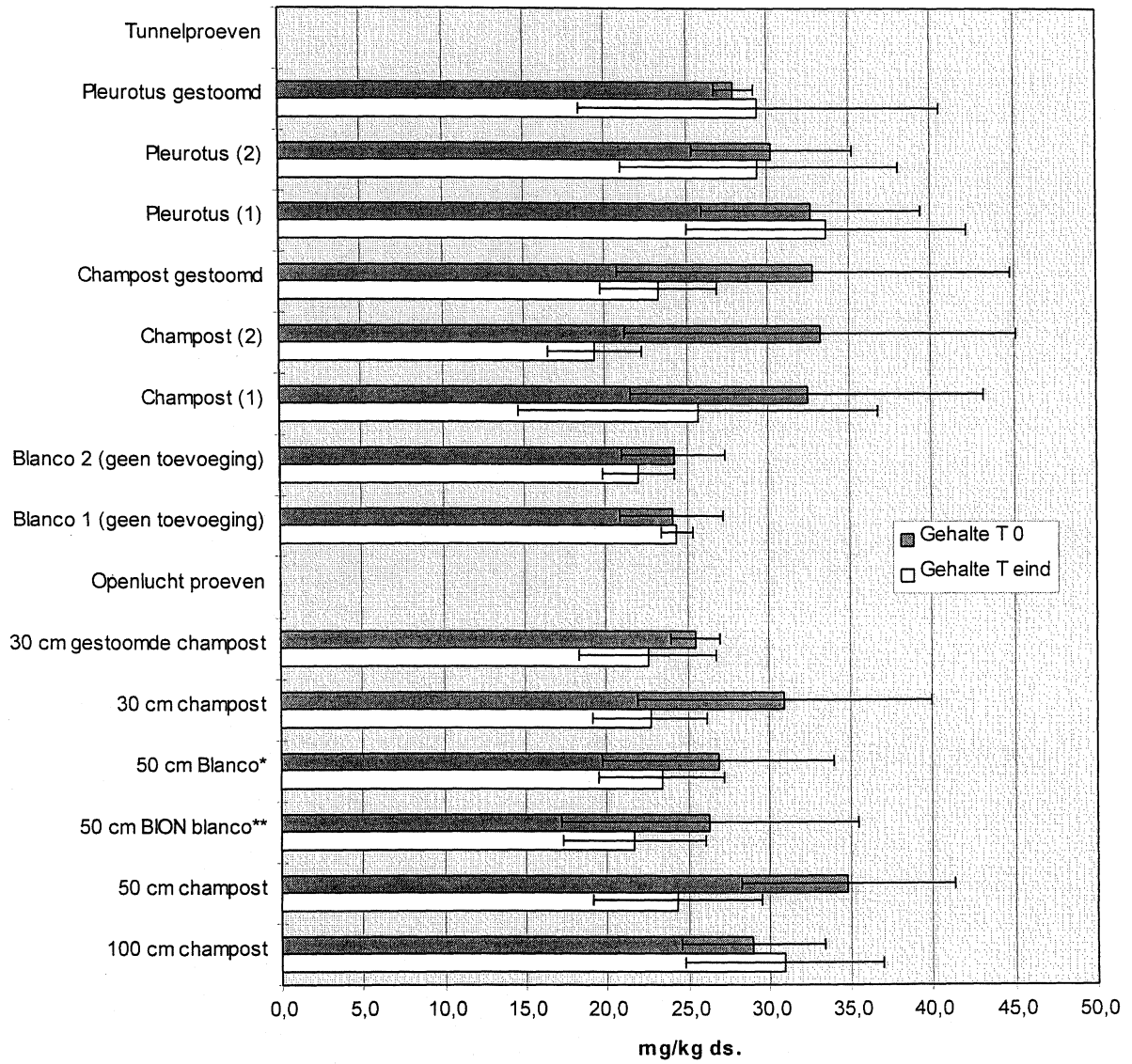
Type experiment	In tunnels met Petroleumhaven-specie	In terraria met Petroleumhaven-specie	In terraria met gasfabrieksgrond	In terrarium met verse baggerspecie	In de open lucht met verschillende laagdikten
Onbehandeld	+	+	+	+	+
Toediening van meststoffen (Bion-procédé)		+	+	+	+
Toediening van champost	+	+	+	+	+
Toediening van bij 70°C gestoomde champost	+		+	+	+
Toediening van <i>Pleurotus</i> -residusubstraat	+	+			
Toediening van bij 70°C gestoomd <i>Pleurotus</i> -residusubstraat	+				
Toediening van vers <i>Agaricus bisporus</i> -substraat			+	+	

Resultaten spoor 1

Vrijwel alle analyses zijn in vijfvoud uitgevoerd. Vooronderzoek heeft uitgewezen dat de heterogeniteit van de mengsels van grond/specie met compost dermate groot is dat de spreiding in de analyseresultaten met minder monsters zo groot is dat er geen betrouwbare uitspraken kunnen worden gedaan over het optreden van afbraak van PAK en minerale olie. De schimmels bleken alleen in staat om in tunnels de grond/specie goed te doorgroeien. Onder de omstandigheden in terraria en in het open veld was er niet tot nauwelijks sprake van doorgroeiing. Determinatie wees uit dat de geënte schimmel *Agaricus bisporus* in de openluchtlandfarming na twee maanden volledig was verdrongen door andere schimmels. Dit betekent dat de concurrentiekracht onder de geteste omstandigheden gering is.

Er is afbraak van PAK en olie waargenomen. Deze afbraak varieerde van nihil tot circa 35%. De grootste afbraak werd waargenomen onder de omstandigheden waar compost (gestoomd en met actieve schimmel) of meststoffen werden gedoseerd. Voor de blanco's, waar dus grond of baggerspecie zonder enige toevoeging is gebruikt, is de afbraak beduidend minder (nihil tot circa 10%). De analyseresultaten van alle tests zijn echter omgeven met spreidingen die in de ordegrrootte van het afbraakpercentage liggen. Het gevolg is dat niet aangetoond is dat toepassing van de schimmels *Agaricus bisporus* of *Pleurotus* tot een beter resultaat leidt dan toevoeging van meststoffen (Bion-procédé) of van compost zonder actieve schimmels.

PAK in gelandfarmde baggerspecie



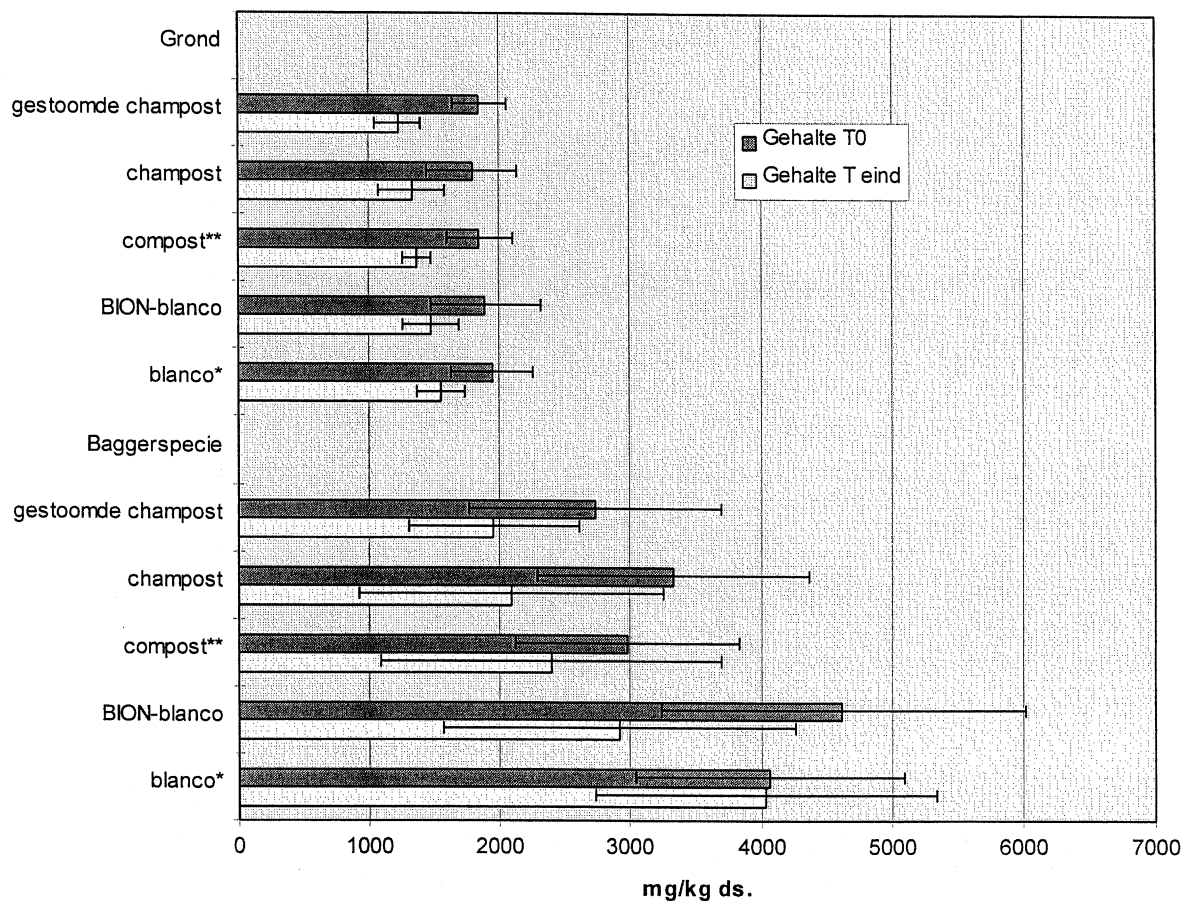
T_{eind} Tunnelproeven: 24 dagen
 Openluchtproeven : 120 dagen

* Geen toevoegingen

** Alleen meststoffen

De afbraak in terraria van minerale olie in grond en baggerspecie afkomstig van een gasfabriek respectievelijk een petroleumhaven

Olie in grond en baggerspecie



T_{eind} Baggerspecie: 4 maanden
Grond : 4 maanden

* Geen toevoegingen

** Compost met vers substraat Agaricus B

Spoor 2: xenobiotica

Aanpak

Over de afbraak van xenobiotica met witrotschimmels is minder bekend dan over de afbraak van PAK. Om deze reden is spoor 2 begonnen met een literatuuronderzoek naar de biodegradatie van xenobiotica door witrotschimmels. Het literatuuronderzoek had als doel tot een keuze van schimmels te komen. Evenals bij spoor 1 bleek evenwel dat de schimmels *Agaricus bisporus* of *Pleurotus* de beste vooruitzichten boden in verband met beschikbaarheid van substraat in combinatie met ligninolytische eigenschappen. Schimmels als *Phanerochaete chrysosporium* en *Beijerkandera Boss 55* boden technisch gezien betere vooruitzichten, economisch echter niet. In het laboratorium zijn met *Agaricus bisporus* en *Pleurotus* de volgende experimenten uitgevoerd:

1. vaststellen van de optimale omstandigheden voor schimmelgroei in met PCB's, HCH, DDT en dioxinen verontreinigde grond;
2. vaststellen wat de afbraak is van deze verontreinigingen onder optimale omstandigheden.

Resultaten

Er is gebruikgemaakt van een mengsel van drie gronden die verontreinigd zijn met DDT, HCH, PCB's en dioxinen, met na menging een concentratie van:

- som van HCH 12,0 mg/kg;
- som van o,p-DDE, p,p-DDE, o,p-TDE en p,p-DDT 0,8 mg/kg;
- som van de PCB's 28, 52, 101, 118, 138, 153 en 180 0,1 mg/kg;
- totale toxiciteitsequivalent (TEQ) van dioxinen 46,7 µg/kg;
- totale TEQ van planaire PCB's 1,9 µg/kg.

Met dit grondmengsel is aan de hand van CO₂- en enzymactiviteitsmetingen nagegaan of er na menging met champost en residu *Pleurotus*-substraat sprake was van een toxische werking van verontreinigingen op de groei van schimmels en onder welke omstandigheden er optimale biologische activiteit optrad. Ook is nagegaan wat de specifieke activiteit was van schimmels door gestoomde en niet-gestoomde teeltresiduen in te zetten. De optimale temperatuur bleek op 25°C te liggen, wat de temperatuur is waaronder *Agaricus bisporus* en *Pleurotus* optimaal groeien. Bij een hogere temperatuur neemt de biologische activiteit toe, wat echter volledig moet worden toegeschreven aan andere micro-organismen dan deze schimmels. Verder is gebleken dat de CO₂-productie ongeveer wekelijks halveert, waardoor het weinig zin heeft om experimenten langer dan twee maanden te laten doorlopen.

Onder de in het vooronderzoek vastgestelde optimale omstandigheden zijn in het laboratorium vier experimenten uitgevoerd met de grond- en compostmengsels. De microbiologische activiteit van deze experimenten was hoog, wat leidde tot afbraak van organische stof van 31-37%. Ondanks dat ook hier de analyses in vijfvoud zijn uitgevoerd, kon er geen afbraak van verontreinigingen worden aangetoond.

CONCLUSIES

Gebruik van residueel substraat doorgroeit met de schimmels *Agaricus bisporus* en *Pleurotus spp.* kan leiden tot verdergaande afbraak van PAK en olie in grond en gerijpte baggerspecie. Deze afbraak is echter niet toe te schrijven aan de activiteit van de schimmels, maar aan de activiteit van andere micro-organismen die worden gestimuleerd of ingebracht door de compost en de daarin aanwezige meststoffen.

Om trends aan te tonen in processen waarin heterogene mengsels zoals grond gemengd met compost voorkomen, is minimaal bemonstering en analyse in vijfvoud nodig. De spreiding in de resultaten is dermate groot dat met minder analyses een trend niet aantoonbaar is.

Onder optimale omstandigheden leidt gebruik van doorgroeit residueel substraat tot een aanzienlijke verhoging van de biologische activiteit, waardoor binnen twee weken 31 tot 37% van de toegevoegde biomassa is gemineraliseerd. Deze hoge mate van mineralisatie is niet toe te schrijven aan de activiteit van de schimmels *Agaricus bisporus* en *Pleurotus* (aangezien deze mineralisatie ook optrad bij gestoomde residucompost) maar aan de microbiële activiteit in dit substraat. Gebruik van gestoomde compost uit de commerciële schimmelteelt kan voor PAK en minerale olie daarom tot betere resultaten leiden in de biologische on-site- of indoorgrondreiniging.

Ondanks de hoge mate van biologische activiteit onder optimale omstandigheden is noch met compost met de actieve schimmels *Agaricus bisporus* en *Pleurotus* noch met gestoomde compost afbraak van DDT, HCH, PCB's of dioxinen aangetoond.

Het is opmerkelijk dat in veel wetenschappelijke publicaties wel duidelijke afbraak van PAK, DDT en PCB's wordt gemeld onder invloed van witrotschimmels, waaronder *Pleurotus*-soorten. In dit type onderzoek wordt veelal gebruikgemaakt van kunstmatig verontreinigde materialen, die beter beschikbaar zijn voor de enzymen van schimmels dan de gronden/baggerspecie die vele tientallen jaren geleden verontreinigd zijn geraakt. Door deze veroudering zijn verontreinigingen biologisch minder beschikbaar.

SUMMARY

Biodegradation of micro pollutants with fungi

Reasons for the study

Many contaminants in the soil can be degraded with the aid of bacteria. Well-known examples are volatile organic compounds, monocyclic aromatics and some polycyclic aromatics. Soil contaminants, however, can also consist of more complex compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorobiphenyls (PCBs), hexachlorocyclohexane (HCH), and dioxins. These compounds can occur both in the soil and in sediments/sludge. The bacterial degrading processes for these complex compounds are considerably slower than for the less complex compounds mentioned earlier. This disappointing degradation can have several causes, such as the unavailability of pollutants to bacteria (due to a strong adsorption or the size of the molecules) or the absence of favourable conditions encouraging bacterial degradation. PAH with four or more rings, for example, or PCB with four or more chlorine atoms, resist bacterial degradation.

With their extracellular lignolytic enzymes, whiterot fungi are capable of degrading lignin. This lignin degradation occurs through non-specific radical reactions, which cause other complex compounds to be degraded in their turn. Many of the aforementioned contaminants, which share structural characteristics with parts of the lignin, can basically be degraded by these enzymes.

A literature search revealed that fungi with a high degree of lignolytic enzyme activity, such as *Phanerochaete chrysosporium* and *Bjerkandera Boss 55*, are capable of degrading a number of the above pollutants under controlled and monitored circumstances in the laboratory. The study presented here, which was conducted in the framework of the Dutch Research Programme In-Situ Bioremediation (NOBIS), was aimed at speeding up the degradation of PAH, PCBs, DDT, HCH and dioxins through the deployment of such fungi.

Study aim

The study primarily focused on optimizing and extending the application of fungi in cost-effective decontamination of soil and sludge contaminated by persistent cyclic hydrocarbons. The following persistent pollutants were selected: PAH, mineral oil, PCBs, DDT, HCH, and dioxins.

The methodology followed two parallel tracks:

1. Track 1 aimed at testing, upgrading and refining a method deploying fungi for the degradation of PAH and mineral oil, comparing it to other biological methods with a similar aim;
2. Track 2 aimed at developing methods involving the use of fungi for the degradation of PCBs, DDT, HCH, and dioxins.

Selection of fungi

In view of the major importance attached to the economical feasibility of the methods, the choice was made in favour of residual substrata fungi which are commercially grown in the Netherlands. These are the common mushroom (*Agaricus bisporus*) and the oyster mushroom (*Pleurotus spp.*). The crop residue of the mushroom cultivation (spent mushroom compost) is called *champost* in the Netherlands. The deployment of these residues in biological soil clean-ups creates a potential win-win situation:

- recycling of a waste substance;
- cleaning of the soil;
- reduction of costs.

A literature search showed that *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* contain lignolytic enzymes, although these are less active than the enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* and *Bjerkandera Boss 55*. The use of the latter fungi - although technically feasible - is rendered uneconomical by high growing costs.

Track 1: PAH and mineral oil

Approach

Track 1 initiated a series of bench scale experiments, using the knowledge gained from literature and the experiences of individual consortium members with regard to landfarming, biological decontamination and methods involving fungi. The tests used long-term landfarmed sludge from the Amsterdam Petroleum Harbour, which had been seriously contaminated by mineral oil and PAHs. This sludge was selected deliberately: it had already been used to test many biological cleaning techniques, demonstrably resulting in a degradation of PAH and oil. The use of this landfarming residue, which was - to a certain extent - still contaminated by PAH (± 40 mg/kg) and mineral oil (± 3000 mg/kg), served to determine whether the degradation by fungi would continue beyond the point where other biological methods stagnated.

The landfarmed sludge was tested under various conditions. Additional experiments were conducted with soil from a former gas plant site and fresh sludge from a drainage ditch near a former coking plant. These tests were aimed at:

1. determining the effectiveness of the mushroom substrate (both fresh and spent) and fresh and spent *Pleurotus*-substrate in different dosages;
2. determining the best conditions for degradation by fungi (tunnels, indoor landfarming, open-air landfarming, layer thickness);
3. determining the consequences of changes in the structure of the soil/species by applying substrate in the shape of compost;
4. determining the consequences of administering a wide-spectrum to the biomass.

The following experiments were conducted:

Type experiment	In tunnels with Petroleum H. sludge	In terraria with Petroleum H. sludge	In terraria with soil from gas plant	In terrarium with fresh dredging sludge	In open air with different layer thicknesses
Untreated	+	+	+	+	+
Administering fertilizers (Bion procedure)		+	+	+	+
Administering <i>champost</i>	+	+	+	+	+
Administering <i>champost</i> steamed at 70°C	+		+	+	+
Administering <i>Pleurotus</i> residual substrate	+	+			
Administering	+				

<i>Pleurotus</i> residual substrate steamed at 70°C					
Administering fresh <i>Agaricus bisporus</i> substrate			+	+	

Results Track 1

Nearly all analyses were conducted in fivefold. Preliminary research showed that, due to the great heterogeneousness of the mixtures of soil/sludge with compost, a lesser number of samples would create too wide a dispersion of the analysis results, thereby precluding any reliable conclusions on the degradation of PAH and mineral oil .

Only in tunnels did the fungi prove capable of proper penetration of the soil or sludge. The conditions offered in terrariums and in the open air did little or nothing to encourage penetration. The grafted fungus *Agaricus bisporus* in the open-air landfarming was shown to be completely displaced by other fungi after two months. This meant that the competitive force was slight under the testing conditions. The observed degradation of PAH and mineral oil measured from nil to some 35%. The largest degradation was observed under conditions whereby dosages of compost (steamed and with active fungus) or fertilizers were administered. The degradation was considerably less extensive (nil to about 10%) in the control cases, where soil or sludge without any addition was used. The analysis results of all tests, however, were surrounded by dispersions similar to the degradation percentages. They did therefore not support the conclusion that the application of the fungi *Agaricus bisporus* or *Pleurotus* leads to better results than the administering of fertilizers (Bion procedure) or compost without active fungi.

Track 2: xenobiotics

Approach

Less data are available on the degradation of xenobiotics with the aid of whiterot fungi than on the degradation of PAH, which is why Track 2 commenced with a literature search on the bio-degradation of xenobiotics by whiterot fungi. The aim of the search was to arrive at a selection of fungi. As occurred in Track 1, the fungi *Agaricus bisporus* or *Pleurotus* appeared to offer the best prospects with regard to the availability of the substrate in combination with lignolytic characteristics. The fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Bejerkandera Boss 55* offered better prospects from a technical point of view; economically, however, they were less feasible. The following laboratory experiments were conducted with *Agaricus bisporus* and *Pleurotus*:

1. determining the best conditions for the growth of fungi in soil contaminated by PCBs, HCH, DDT and dioxins;
2. determining the degree of degradation of these pollutants under the most favourable conditions.

Results

Three types of soil contaminated by DDT, HCH, PCBs and dioxins were mixed, resulting in a product with the following contents:

- sum of HCH 12.0 mg/kg;
- sum of o,p-DDE, p,p-DDE, o,p-TDE and p,p-DDT 0.8 mg/kg;
- sum of the PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 en 180 0.1 mg/kg;
- total toxicity equivalent (TEQ) of dioxins 46.7 µg/kg;
- total TEQ of planar PCBs 1,9 µg/kg.

After adding *champost* and residual *Pleurotus* substrate to the soil, the CO² and enzyme activities in the mixture were monitored to determine possible toxic effects of the pollutants on the growth of the fungi and the conditions most favourable to biological activity. The specific activities of fungi stimulated by steamed and unsteamed crop residues were also investigated.

The best growth-stimulating temperature for *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* proved to be 25°C. At higher temperatures, the biological activity increased, but this should be ascribed entirely to micro-organisms other than these fungi. It was also proved that the production of CO₂ is halved more or less every week; there is thus little sense in prolonging experiments beyond a period of two months.

Four experiments involving the soil/compost mixtures were conducted in the laboratory under the highly favourable conditions defined in the preliminary study. The micro-biological activity in these tests was high, achieving a degradation of organic substances of 31-37%. Although these analyses, too, were conducted in fivefold, no degradation of contaminants could be demonstrated.

CONCLUSIONS

The use of residual substrate impregnated with the fungi *Agaricus bisporus* and *Pleurotus spp.* can achieve a more extensive degradation of PAH and mineral oil in soil and matured sludge. This degradation, however, can be contributed to the activity not of the fungi, but of other micro-organisms which are activated or introduced by the compost and the fertilizers contained in it.

Sampling and analysis will have to be executed at least in fivefold, if trends are to be demonstrated in processes in which heterogeneous mixtures such as soil mixed with compost play a role. The dispersion in the analysis results is such as to obscure trends when fewer analyses are conducted.

Well-penetrated residual substrate under highly favourable conditions will succeed in raising the biological activity to a considerable extent, mineralizing 31 to 37% of the added biomass within two weeks. As the mineralization also occurred with steamed residual compost, it is to the microbial activity of the substrate, rather than the activity of the fungi *Agaricus bisporus* and *Pleurotus*, that this high degree of mineralization should be contributed. It may be concluded that the use of steamed compost from commercial fungus farms can upgrade the results with PAH and mineral oil in biological clean-up operations, both in-situ and indoors.

In spite of the high degree of biological activity under optimum conditions, no degradation of DDT, HCH, PCBs or dioxins was proved, neither with compost containing the active fungi *Agaricus bisporus* and *Pleurotus*, nor with steamed compost.

It is remarkable that many scientific publications report clearly observed degradation of PAH, DDT and PCB, due to whiterot fungi belonging to the *Pleurotus*-family and other kinds. These types of study often make use of artificially contaminated materials, which are more easily available to enzymes of fungi than soil or sludge contaminated several decades ago. The ageing causes the contaminants to be less available.

SPOOR 1

**TOEPASSINGSMOGELIJKHEDEN VAN SCHIMMELS UIT DE CHAMPIGNONTEELT BIJ DE
REINIGING VAN MET PAK EN MINERALE OLIE VERONTREINIGDE BAGGERSPECIE EN GROND**

J. Harmsen, A. van den Toorn, D. Riedstra en J.A.N.M. Heersche

SAMENVATTING

Schimmels zijn in staat om met hun extracellulaire ligninolytische enzymen verontreinigingen als polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) af te breken. Met name in waterbodems komt PAK veel als verontreiniging voor. In dit onderzoek is gebruikgemaakt van substraten afkomstig van de teelt van eetbare paddestoelen: *Pleurotus* (oesterzwam) en *Agaricus bisporus* (champignon). De enorme hoeveelheden in Nederland geteelde champignons leveren uiteindelijk ook grote hoeveelheden residu, die kunnen oplopen tot 5 kilogram per kilo verse champignons. Dit residu bestaat uit restcompost met zowel schimmelmycelium als residuele nutriënten, maar is te 'arm' voor verdere rendabele paddestoelproductie. Het residu is goedkoop inzetbaar, wat de haalbaarheid van de technologie ten goede zou komen.

In dit onderzoek is nagegaan of toepassing van schimmels afkomstig uit de champignonteelt een toegevoegde waarde heeft bij de reiniging van met PAK verontreinigde baggerspecie. Deze toegevoegde waarde moest blijken uit het beter kunnen afbreken van de minder biologisch beschikbare PAK, nog aanwezig na de ontwatering, dan de endogene microbiële populatie.

Onderzoek heeft plaatsgevonden in gecontroleerde tunnels bij het Proefstation voor de Champignoncultuur in Horst, bij de bodemreiniger BION in Almelo en op de landfarm bij Kreekraksluizen. Er is hoofdzakelijk gebruikgemaakt van Petroleumhaven-specie om vergelijkingen te kunnen maken met ander onderzoek.

De resultaten lieten zien dat toevoeging van substraat een positief effect had op de afbraak van PAK. Het waren echter niet de schimmels die verantwoordelijk zijn voor de afbraak, omdat de resultaten van substraat met actieve schimmel en gedeactiveerde schimmel vergelijkbaar waren.

Het is, vooral in een buitensituatie als een landfarm, moeilijk om de schimmels actief te houden gedurende de behandelperiode. De al aanwezige micro-organismen kunnen de toegevoegde schimmel volledig doen verdwijnen.

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

In het NOBIS-project *Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie* zijn verschillende onderzoeken uitgevoerd naar de afbraak van polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) door het Proefstation voor de Champignoncultuur, de Katholieke Universiteit Nijmegen, BION en DLO-Staring Centrum. De doelstelling van het onderzoek was na te gaan of de schimmels een toegevoegde waarde hebben bij de reiniging van met PAK verontreinigde baggerspecie. Doordat de goed beschikbare PAK's al worden afgebroken tijdens de ontwatering van baggerspecie, moeten de toegevoegde schimmels in staat zijn om de moeilijker beschikbare PAK's beter af te breken dan de endogene microbiële populatie.

In een literatuurstudie zijn de mogelijkheden voor de afbraak van xenobiotica door schimmels aangegeven [Dijkerman e.a., 1997]. Onder gecontroleerde omstandigheden zijn de mogelijkheden voor afbraak van PAK getoetst door het proefstation en SC-DLO [Van den Toorn e.a., 1997a]. BION heeft in terrariumproeven nagegaan in hoeverre de technologie kan worden toegepast in hallen die worden gebruikt voor de biologische reiniging van verontreinigde grond [Riedstra e.a., 1997 en 1998]. En in een landfarm in de buitenlucht is nagegaan wat de toepasbaarheid van de gebruikte schimmels onder veldomstandigheden is [Van den Toorn e.a., 1997b].

In dit onderzoek is gebruikgemaakt van substraten die afkomstig zijn van de teelt van eetbare paddestoelen: *Pleurotus* (oesterzwam) en *Agaricus bisporus* (champignon). In Nederland is in 1993 circa 190 miljoen kilo champignons geproduceerd [Van Horen, 1994]. De enorme hoeveelheden champignons leveren uiteindelijk ook grote hoeveelheden residu, die kunnen oplopen tot 5 kilogram per kilo verse champignons. Dit residu bestaat uit restcompost met zowel schimmelmycelium als residuele nutriënten, maar het is te 'arm' voor verdere rendabele paddestoelproductie. Het residu is goedkoop inzetbaar, wat de haalbaarheid van de technologie ten goede zou komen. Ter vergelijking: speciaal voor bodemreiniging geteeld substraat (verse champost) kost rond de f 300,- per ton.

Binnen dit onderzoek is geen aandacht besteed aan het gebruik van *Bjerkandera sp. BOS55*. Dit is een schimmel die uitgebreid is getoetst bij de Landbouwwuniversiteit Wageningen (LUW) in het kader van het PBTS-programma. Helaas was het niet mogelijk om dit onderzoek te incorporeren in het onderzoek van het NOBIS-consortium. NOBIS heeft in juni 1998 opdracht verleend aan de LUW om *Bjerkandera sp. BOS55* te testen in de in dit onderzoek onderzochte Petroleumhaven-specie. Deze resultaten worden afzonderlijk gerapporteerd. Voor het hier onderzochte concept geldt dat *Bjerkandera*-substraat speciaal moet worden geteeld - in tegenstelling tot champost, dat in grote hoeveelheden beschikbaar is.

Het meeste onderzoek is uitgevoerd op baggerspecie uit de Petroleumhaven in Amsterdam. Deze specie is ook gebruikt in projecten van POSW en de STOWA. Door gebruik te maken van de resultaten hiervan, kunnen de resultaten van dit onderzoek beter worden geïnterpreteerd.

Dit rapport is de afsluitende rapportage van het onderdeel dat betrekking heeft op de afbraak van PAK en minerale olie en op de rol die de onderzochte schimmels hierin kunnen spelen. Er is gebruikgemaakt van de hierboven vermelde rapportages.

HOOFDSTUK 2

ENZYSYSTEMEN VAN SCHIMMELS

Witrotschimmels zijn vanwege hun productie van extracellulaire ligninolytische enzymen in staat om lignine af te breken. Lignine is een complexe polymeer, die wordt gekenmerkt door een veelvoud van chemische bindingen. Dit wordt veroorzaakt doordat er bij de synthese allerlei radicaalgedreven polymerisaties plaatsvinden. Bij de afbraak wordt lignine via radicaalmechanismen aangevallen. Dit maakt de afbraak van lignine non-specifiek. Het gevolg is ook dat veel verontreinigingen vanwege de structurele overeenkomst ervan met onderdelen van lignine in principe kunnen worden afgebroken door het ligninolytisch systeem van deze schimmels. In tabel 1 is weergegeven welke enzymen kunnen worden geproduceerd door de in dit onderzoek gebruikte schimmels [Dijkerman e.a., 1997]. Ook zijn gegevens opgenomen over *Bjerkandera sp. BOS55*, een schimmel die is gebruikt bij onderzoek op de Landbouwniversiteit Wageningen en over *P. Chrysosporium* (een veel in de literatuur vermelde schimmel).

Tabel 1 Productie van extracellulaire enzymen door enkele schimmels

	Ligninolytische enzymen					
	Lignine peroxidase	Mangaan peroxidase	Peroxidase	Laccase	Glyoxal oxidase	Arylalcoholoxidase
<i>Agaricus biporus</i>	(+)	+		+		
<i>Pleurotus ostrearius</i>	-	+		+		+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+	+	-	-	+	-
<i>Bjerkandera sp. BOS55</i>	+	+	+	+	+	+

Uit de studie van Dijkerman e.a. [1997] blijkt dat er veel bekend is over de mogelijkheden van *P. chrysosporium* om xenobiotica af te breken. Over de concrete toepassing van deze witrotschimmel is echter weinig bekend. De schimmel heeft een hoog temperatuuroptimum voor groei en xenobioticumafbraak. Bovendien lijken de ligninolytische enzymen alleen onder N-limitatie te worden geproduceerd.

Voor *Pleurotus* (oesterzwam) is aangetoond dat afbraak van xenobiotica mogelijk is. Er lijkt niets op tegen om residuen van de productie van eetbare paddestoelen in te zetten voor bioremediatie. In dit onderzoek zijn de mogelijkheden van *Pleurotus* (oesterzwam) en *Agaricus biporus* (champignon) onderzocht.

Deze basidiomyceten produceren extracellulaire enzymen die een belangrijke rol spelen bij de afbraak van ligninen (na cellulose de voornaamste componenten in plantaardige vezels). Met name uit studies met de witrotter *Phanerochaete chrysosporium* is gebleken dat deze enzymen een sleutelrol vervullen bij de afbraak van verschillende xenobiotica.

Het residu dat overblijft na commerciële productie van eetbare paddestoelen, is sterk gekoloniseerd met schimmelbiomassa en kan daarom in principe goed direct als entmateriaal worden gebruikt. Dat de schimmel nog actief is, blijkt uit het feit dat in het residu nog voldoende laccase-activiteit aanwezig is [Smith e.a., 1989].

Champignon en oesterzwam groeien bij gematigde temperaturen (rond kamertemperatuur). Dit in tegenstelling tot *P. chrysosporium*, die veel beter groeit bij een temperatuur rond de 40°C. De productie van ligninolytische enzymen wordt bij beide schimmels gestimuleerd onder stikstofrijke omstandigheden. Compost-schimmelresiduen bevatten nog voldoende nutriënten voor schimmelgroei en om een goede productie van deze enzymen te waarborgen. Daarnaast is er in de residuen ook nog voldoende lignine aanwezig voor inductie van de enzymen.

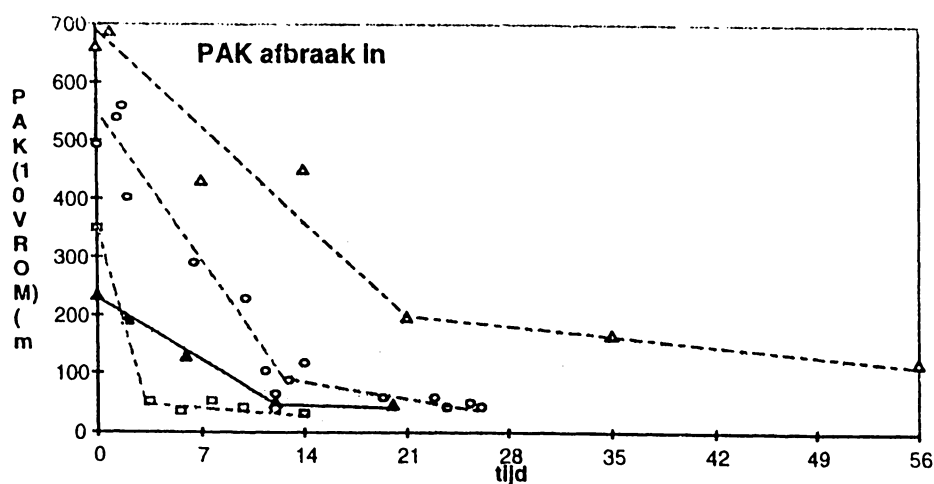
HOOFDSTUK 3

BIOLOGISCHE AFBRAAK VAN PAK IN PETROLEUMHAVEN-SPECIE

Bij het onderzoek is gebruikgemaakt van baggerspecie die afkomstig is uit de Petroleumhaven in Amsterdam. Deze specie is al uitgebreid onderzocht binnen POSW en STOWA. De oorspronkelijke specie is zwaar verontreinigd met PAK (500-2000 mg/kg d.s.) en minerale olie (circa 12.000 mg/kg d.s.) In het STOWA-onderzoek naar de karakterisering van baggerspecie [Doddema e.a., 1998] is aangetoond dat PAK in de Petroleumhaven goed afbreekbaar is. Met een chemische toets (extractie met 70% azijnzuur) wordt voorspeld dat 70% van de PAK afbreekbaar is. Met een opvolgende biologische toets is aangetoond dat 80% van de PAK op korte termijn ook werkelijk afgebroken kan worden.

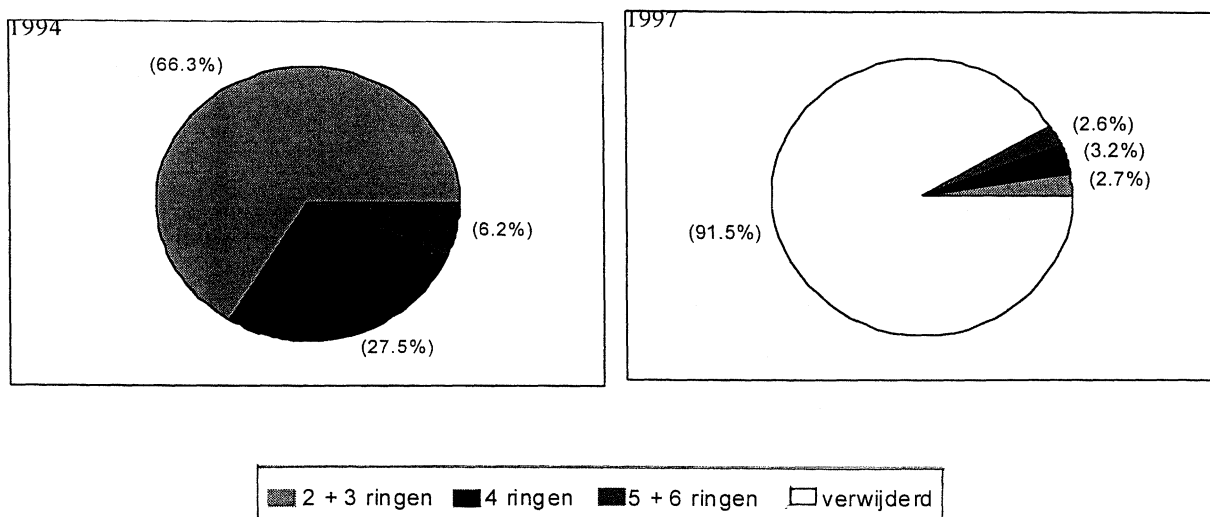
Deze getallen zijn in overeenstemming met afbraak die in de praktijk is gevonden. Ferdinandy [1998] heeft de afbraak gegeven voor verschillende systemen die zijn onderzocht binnen POSW (figuur 1). De meest intensieve behandeling heeft plaatsgevonden in de bioreactor van Bird. Landfarming is de meest extensieve bewerking. Geconcludeerd mag worden dat de snelheid waarmee de biologisch beschikbare fractie wordt afgebroken, afhankelijk is van de behandelingsintensiteit: hoe intensiever, hoe sneller.

Niet in deze figuur staat een intensieve behandeling in een reinigingshal. Hier bleek het niet mogelijk om de specie op korte termijn te ontwateren, waardoor de specie ondanks de intensieve behandeling anaëroob bleef en er dus geen afbraak plaatsvond.



Figuur 1 De biologische afbraak van PAK in verschillende systemen [Ferdinandy, 1998]: \square = bioreactor, totale specie (Bird), tijd in weken; \square = labproeven, fijne fractie (TNO), tijd in weken; Δ = landfarming, totale specie (SC-DLO), tijd in maanden; \circ = beluchtingsbasin, fijne fractie (TNO), tijd in weken

Er heeft afbraak plaatsgevonden van alle ringsystemen. Lichte PAK's worden naar verwachting het beste afgebroken, maar ook de moeilijker afbreekbare 5- en 6-ringen zijn gedeeltelijk afgebroken (figuur 2) [Harmsen e.a., 1998].



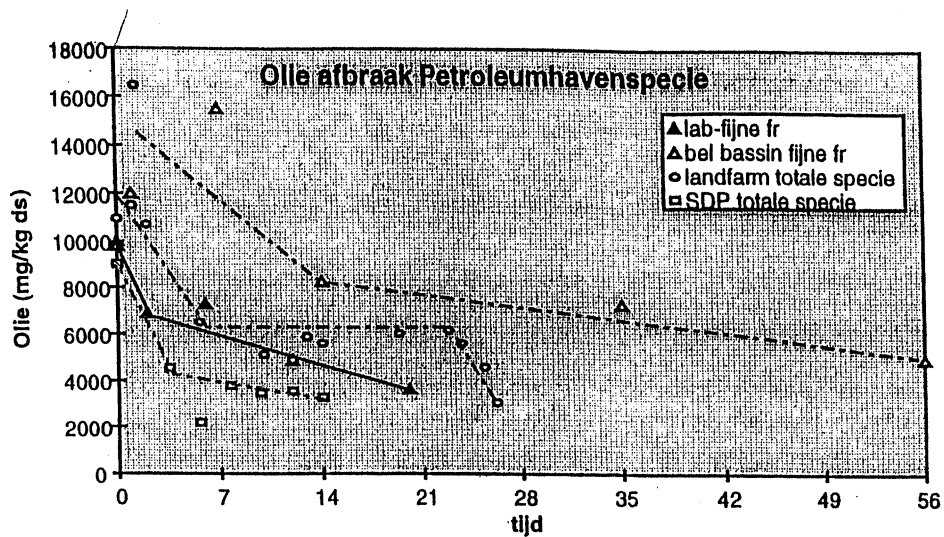
Figuur 2 PAK-samenstelling in Petroleumhaven-specie voor en na biologische reiniging via landfarming (respectievelijk 1994 en 1997)

In het landfarmingsonderzoek is nadat de specie ontwaterd is ook een intensievere behandeling in een kasfarm toegepast. Op dat moment was het PAK-gehalte al gedaald van 533 mg/kg d.s. tot 120 mg/kg d.s. (9 van Staring). Als gevolg van een hogere temperatuur en intensievere beluchting daalt het PAK-gehalte binnen enkele maanden tot circa 40 mg/kg d.s.

Een vergelijkbaar beeld als voor de afbraak van PAK wordt verkregen voor de afbraak van minerale olie (figuur 3). Opvallend hierbij is de hoge restconcentratie minerale olie in Petroleumhaven-specie, die moeilijk afbreekbaar blijkt te zijn.

Met deze resultaten moet rekening worden gehouden bij de inzet van schimmels. Intensivering van de behandeling leidt ook zonder toevoeging van schimmels al tot lagere gehalten. De endogene microbiële populatie is bij een extensieve behandeling ook in staat de verontreiniging langzaam af te breken.

In een studie naar de risico's van met landfarming behandelde baggerspecie is ook aandacht besteed aan de biologisch beschikbare fractie in de gerijpte Petroleumhaven-specie [Harmsen e.a., 1998]. Gebruikmakend van de in het karakteriseringsonderzoek [Doddema e.a., 1998] ontwikkelde azijnzuurextractie, is 34% van de PAK in ontwaterde baggerspecie op korte termijn beschikbaar. Met de door Cornelissen e.a. [1997] ontwikkelde Tenax-toets werden afhankelijk van de mate van rijping (is ook mate van afbraak) snel biologisch beschikbare fracties gevonden tussen de 10 en 40%. Hieruit kan worden geconcludeerd dat bij de reiniging van de in dit onderzoek gebruikte ontwaterde Petroleumhaven-specie circa 30% afbreekbaar is door de endogene populatie.



Figuur 3 De biologische afbraak van minerale olie in verschillende systemen [Ferdinandy, 1998]: □ = bioreactor, totale specie (Bird), tijd in weken; // = labproeven, fijne fractie (TNO), tijd in weken; Δ = landfarming, totale specie (SC-DLO), tijd in maanden; ○ = beluchttingsbasin, fijne fractie (TNO), tijd in weken

HOOFDSTUK 4

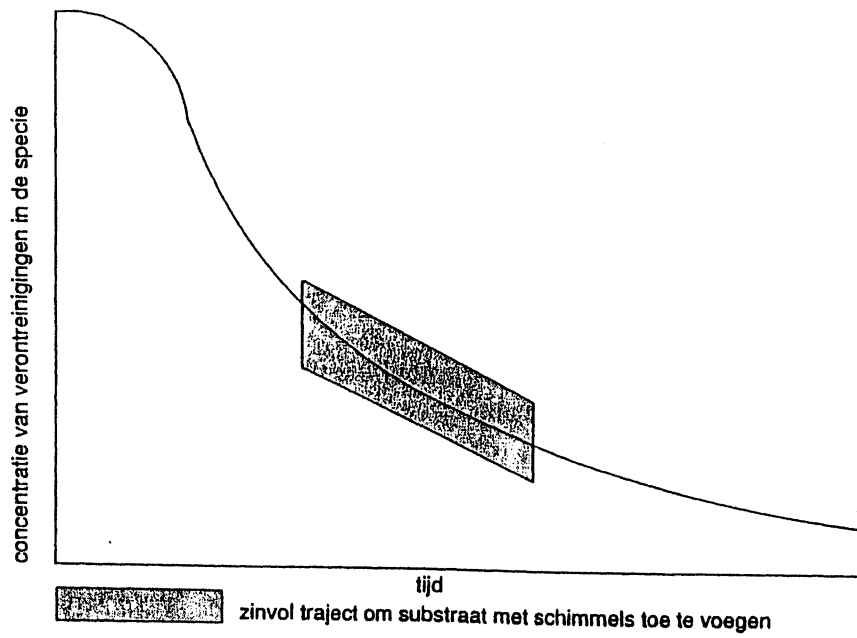
TOEPASSINGSUITGANGSPUNTEN BIJ DE REINIGING VAN BAGGERSPECIE MET SCHIMMELS

PAK en minerale olie zijn goed afbreekbaar door de endogene populatie in de bodem. Voorwaarde is dat de bodem een aërobe structuur heeft. Bij de afbraak verdwijnt de biologisch beschikbare fractie en blijft een restfractie over, die slecht beschikbaar is en daardoor ook slechts langzaam afbreekt. De grootte van de biologisch beschikbare fractie is niet constant en kan variëren van enkele procenten tot bijna 100%.

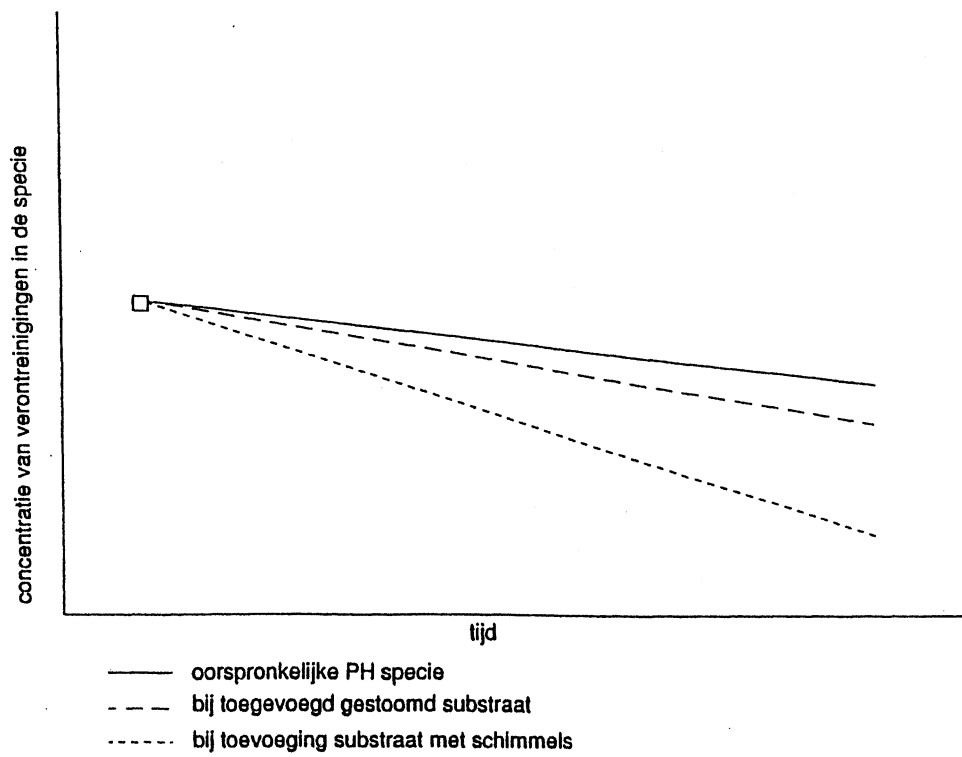
Aan de voorwaarde voor aerobie wordt niet voldaan in een verse baggerspecie. Alle poriën zijn hierbij gevuld met water, en de specie is anaëroob. De specie moet worden ontwaterd, waarbij watergevulde poriën worden vervangen door gasgevulde poriën. Ontwateren moet niet gelijk worden gesteld aan drogen. Als baggerspecie wordt gedroogd, ontstaan er meestal harde, steenachtige brokken. Bij ontwateren moet ook sprake zijn van rijping, waardoor een grond met goede structurele eigenschappen wordt verkregen. Voor deze wijze van ontwateren is tijd nodig. In dezelfde tijd komt door de aanwezigheid van zuurstof ook de biologische afbraak op gang. Op het moment dat in de gehele laagdikte de zuurstofvoorziening voldoende is, is het grootste deel van de biologisch beschikbare fractie afgebroken.

Pas op het moment van volledige ontwatering zijn ook de omstandigheden zodanig dat toegevoegde schimmels kunnen overleven. Het is moeilijk om natte baggerspecie te mengen met schimmelsubstraat, omdat een droog substraat moet worden gemengd met een natte slurry. Zelfs als dit lukt, dan zal de overlevingskans in het ontstane mengsel nihil zijn door de nog steeds heersende anaërobe omstandigheden. Door het 'late' tijdstip van toevoegen hebben schimmels dus geen functie bij de afbraak van de goed beschikbare fractie. Schimmels moeten in baggerspecie de restfractie effectiever kunnen aanpakken. In figuur 4 is weergegeven in welk afbraaktraject het zinvol is om schimmels toe te voegen.

Figuur 5 is een uitvergroting van dit traject, waarbij is weergegeven wat de verwachting is van de toevoeging van substraat en schimmel. In deze figuur is ook aangegeven wat het effect is van substraat zonder schimmel. Dit zal ook een versnelde afbraak geven van de afbraak, wat wordt veroorzaakt door de menging, de toevoeging van nutriënten via het substraat en eventueel verbetering van de aëratie omdat compost de bodemstructuur kan verbeteren.



Figuur 4 *Het verloop in de concentratie van verontreinigingen in baggerspecie tijdens een afbraakexperiment*



Figuur 5 *De verwachte effecten op de concentraties verontreinigingen nadat er is gestoomd of levend substraat is toegevoegd*

HOOFDSTUK 5

UITGEVOERD ONDERZOEK

In de experimenten is al direct rekening gehouden met een toekomstige toepassing. Toevoeging en menging van het substraat moet praktisch mogelijk zijn en de hoeveelheid substraat moet niet leiden tot een te grote verdunning. Als gebruikte mengverhouding is daarom in de meeste experimenten uitgegaan van gelijke hoeveelheden substraat en specie op volumebasis. De experimenten hebben plaatsgevonden op de volgende locaties:

- In tunnels bij het Proefstation voor de Champignoncultuur. Hier kon onder gecontroleerde omstandigheden worden gewerkt, waardoor de potentiële mogelijkheden van schimmels konden worden onderzocht.
- In terrariumopstellingen bij BION. Dit type experimenten is goed vertaalbaar naar de reinigingspraktijk in hallen. In deze opstellingen zijn ook een verse baggerspecie en grond afkomstig van een gasfabrieksterrein onderzocht.
- Op de landfarm bij Kreekraksluizen, waar de toepasbaarheid van schimmels in een buitensituatie is onderzocht.

5.1 Biodegradatie in tunnels

De resultaten van het tunnel-experiment zijn uitgebreid gerapporteerd door Van den Toorn e.a. [1997a en 1997b]. In deze rapportage is een samenvatting van de uitvoering en de resultaten gegeven.

Het Proefstation voor de Champignoncultuur in Horst beschikt over vier zogenaamde tunnels, die bestemd zijn voor de bereiding van champignoncompost. De tunnels zijn voorzien van een betonnen onderbouw met een hoogte van 40 cm. De bovenbouw is gemaakt van sandwichpanelen die bestaan uit polyurethaan met aan weerszijden een bescherm laag van polyester. In de tunnel bevindt zich op het betonnen onderstuk een roestvaststalen (rvs) plaat met vier vierkante openingen van 75x 75 cm. De lengte van de tunnel is inwendig 500 cm, de breedte is 125 cm en de hoogte is 270 cm. Op de openingen in de rvs-plaat kunnen vier rvs-containers worden geplaatst. Een container is 105 cm lang en breed en 180 cm hoog. De inhoud is ongeveer 2 m³. De bodem van de container is geperforeerd. Aan één zijde zijn de containers afgesloten met twee wegneembare schotten. Door in de tunnels met containers te werken, kan na elke fase van het proces het gewicht worden vastgesteld. De handling van de containers gebeurt met een vorkheftruck.

Met een traploos regelbare centrifugaalventilator kan lucht van onder naar boven door de containers worden geblazen. De ruimte onder de containers dient als aanvoer kanaal voor de lucht. Via luchtkanalen die zich aan de buitenzijde van de tunnel bevinden, kan de lucht worden gerecirculeerd. Indien nodig kan tijdens de procesvoering verse buitenlucht worden aangetrokken. De temperatuur tijdens het proces wordt geregeld met een thermostaat die zich in het aanvoer kanaal bevindt. Zo nodig kan stoom worden ingeblazen om de temperatuur te handhaven.



Foto 1 De gebruikte tunnels op het Proefstation voor de Champignoncultuur

Koeling is alleen mogelijk met buitenlucht. In het aan- en afvoerkanaal bevindt zich een meetflens waarmee de hoeveelheid circulatielucht en verse buitenlucht in een tunnel kan worden gemeten. Het is niet mogelijk om de hoeveelheid lucht per container te meten. Ook kan de druk in het aanvoerkanaal worden gemeten. Per tunnel zijn behalve de temperatuurvoelers die voor de temperatuurregeling worden gebruikt ook nog elf PT-100-elementen aanwezig die zijn aangesloten op een 'datataker'. Hiermee wordt de temperatuur van de lucht en van het substraat in de containers gemeten.

De champost die voor het onderzoek is gebruikt, is afkomstig van een proef van het proefstation. In deze teelt is gebruikgemaakt van doorgroeide compost, die is geleverd door de bedrijven van de CNC en die is geënt met *Agraricus bisporus* van het ras Sylvan U1. De dekaarde werd eveneens door de CNC geleverd. De compost werd voor het afdekken bijgevoed met Milli Champ 3000 (1 kg per m²). Tijdens de teelt was een plastic folie onder de compost aangebracht, waardoor deze minder uitdroogt. Het afgewerkte substraat van *Pleurotus* is afkomstig van een teler. *Pleurotus*-substraat bestaat uit gepasteuriseerd stro zonder toevoegingen. In de teelt wordt geen dekaarde gebruikt. De specie en het substraat zijn op basis van volume in gelijke hoeveelheden gemengd.

De biologische afbraak is gevolgd van de volgende mengsels:

- PH-specie (duplo);
- PH-specie + champost (duplo);
- PH-specie + champost gestoomd gedurende twaalf uur bij 70 C;
- PH-specie + *Pleurotus*-substraat (duplo);
- PH-specie + *Pleurotus*-substraat gestoomd gedurende twaalf uur bij 70 C.

De bemonstering is erop gericht geweest om de afbraak gedurende het experiment met een bekende betrouwbaarheid vast te stellen. Hiertoe is nagegaan hoe de monsters moesten worden voorbehandeld en hoe de gehalten moesten worden terugberekend op de oorspronkelijke specie. Dit was vooral van belang bij *Pleurotus*, omdat hierbij gemakkelijk ontmenging optrad door het grote verschil in soortelijke massa van specie en substraat.

Monsters zijn genomen bij de start en aan het einde van het experiment (na 24 dagen). Bemonstering en analyse in vijfvoud bleken nodig te zijn om voldoende betrouwbaarheid te verkrijgen.

De monsters zijn niet cryogeen gemalen volgens NEN 5730, omdat hierbij ontmenging optrad. Betere resultaten werden verkregen door de monsters met een keukenmachine te homogeniseren. In hetzelfde analysemonster waarin PAK en olie zijn gemeten, is het organisch-stofgehalte gemeten om

te kunnen corrigeren naar het gehalte in de oorspronkelijke specie. PAK is gemeten volgens NEN 5771. In voorgaand onderzoek is vastgesteld dat in de Petroleumhaven-specie niet alle PAK's even betrouwbaar kunnen worden gemeten. De PAK is weergegeven als de 9 van Staring. Dit zijn die PAK's die betrouwbaar kunnen worden gemeten. Deze componenten zijn fluoreen, fenantreen, antraceen, fluoranteen, benz[a]antraceen, chryseen, benzo[b]fluoranteen, benzo[k]fluoranteen en benzo[a]pyreen. Het verschil met de reeks van VROM is dat fluoreen en benzo[b]fluoranteen wel worden gemeten en dat naftaleen, benzo[ghi]peryleen en indeno[123-cd]pyreen niet worden gemeten.

Bij de opsplitsing in de verschillende ringsystemen is de volgende verdeling aangehouden:

- 2 + 3 ringen: fluoreen, fenantreen, antraceen, fluoranteen;
- 4 ringen: pyreen, benz[a]antraceen, chryseen, benzo[b]fluoranteen, benzo[k]fluoranteen, benzo[a]pyreen;
- 5 + 6 ringen: dibenz[ah]antraceen, benzo[ghi]peryleen, indeno[123-cd]pyreen.

Voor minerale olie is de NEN 5733 (versie 1991) gebruikt. Het was noodzakelijk om de hoeveelheid florisil aan te passen om storende polaire componenten in het extract te verwijderen. In de huidige versie van NEN 5733 is de hoeveelheid florisil ook aangepast.

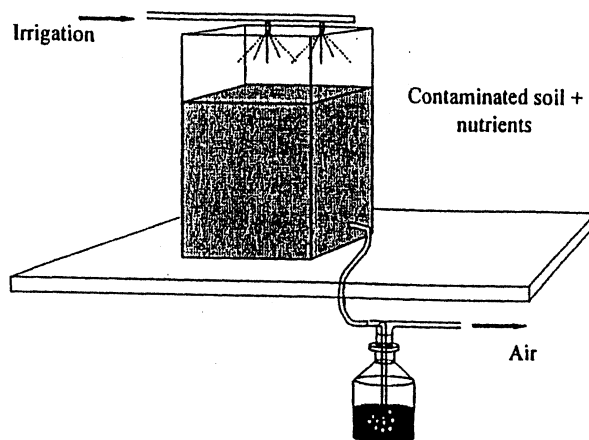
Temperatuur, vocht en zuurstof zijn gemeten in verband met de omgevingsomstandigheden voor de schimmel en mogelijkheid voor aërobe afbraak.

5.2 Terrariumproeven met Petroleumhaven-specie

BION maakt gebruik van terrariumproeven voor het testen van de biologische afbreekbaarheid. De terraria bevatten circa 25 kg per experiment, ze kunnen worden gedraineerd, en zuurstof kan worden doorgeleid (figuur 6). Ook kan het zuurstofverbruik worden gemeten. In de terraria zijn twee series monsters gemeten. De eerste serie was hoofdzakelijk gericht op de doorgroei van de schimmels. In de tweede serie stond de mate van afbraak centraal. Er zijn naast Petroleumhaven-specie ook andere monsters onderzocht.

In de terraria is specie uit de Petroleumhaven onderzocht gedurende een periode van twaalf weken. De gebruikte onderzoeksvarianten zijn weergegeven in tabel 2. De Petroleumhaven-specie was dezelfde als die voor de tunnel-experimenten (hoofdstuk 5.1) is gebruikt.

Bemonstering vond plaats na nul, vier en twaalf weken. PAK en minerale olie zijn in enkelvoud geanalyseerd volgens de procedure die is weergegeven bij de tunnel-experimenten. Bij de BION-blanco is extra stikstof en fosfor toegevoegd in een C:N:P-verhouding van 100:10:5, waarbij de hoeveelheid minerale olie en PAK als koolstofbron is genomen. De terraria hebben onder een lichtkoepel gestaan, waardoor ze niet (zoals bij de tunnelproeven) van daglicht verstoken zijn gebleven. De grond is met 500 ml water per week geïrrigeerd. Daarnaast is de specie dagelijks met een plantensproeier bevochtigd tegen uitdroging van de bovenste centimeters.



Figuur 6 Terrariumopstelling van BION

Tabel 2 Onderzoeksvarianten bij de terrariumproeven met Petroleumhaven-specie

	Substraat	Hoeveelheid [massa%]	substraat	Nutriënten	Opmerkingen
1	<i>Pleurotus</i>	15%		--	
2	<i>Pleurotus</i>	26%		--	
3	<i>Champost</i>	15%		--	
4	<i>Champost</i>	26%		--	
5	Geen	--		--	'echte' blanco
6	Geen	--		+	BION-blanco

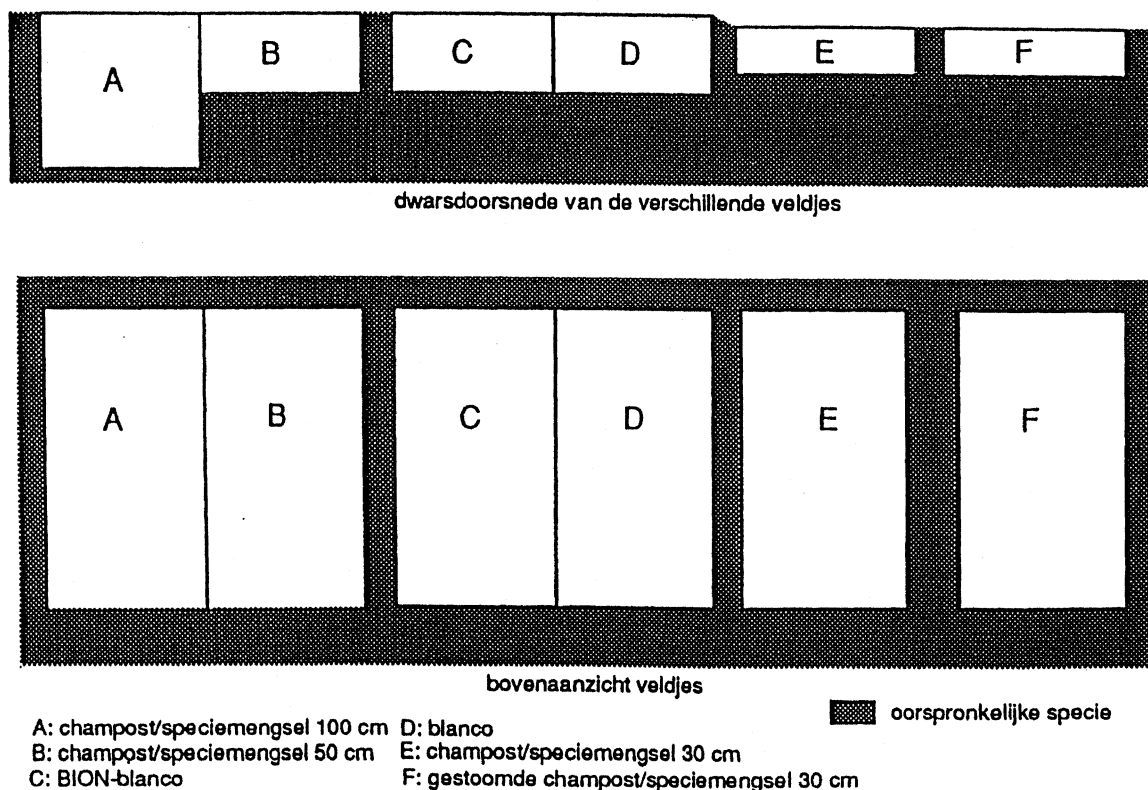
5.3 Toepassing van schimmeltechnologie onder praktijkomstandigheden in de buitenlucht

Bij dit onderzoek was de vraagstelling of de schimmels zich onder praktijkomstandigheden kunnen handhaven en of er op langere termijn er sprake is van een verbeterde afbraak. Bij dit onderzoek is alleen gebruikgemaakt van champost. Dit was gebaseerd op de resultaten van de tunnelproeven en de eerste experimenten bij BION. Een tweede reden was de grotere beschikbaarheid van dit entmateriaal.

De proeven zijn uitgevoerd op het proefveld op de Kreekraksluizen. Als uitgangsmateriaal is oude PH-specie gebruikt met bijmenging van champost. De champost is in een volumeverhouding van 1:1 door de specie gemengd. Er is één bed aangelegd met een dikte van 1 meter. Bij deze dikte kan de aanvoer van zuurstof limiterend worden. Eén bed is aangelegd met een dikte van 50 cm, als voorbeeld van een buitenfarm in de huidige praktijk. Eén bed is aangelegd met een dikte van 30 cm, als voorbeeld van het direct op de kant zetten van baggerspecie. Om de effecten te kunnen vergelijken met de huidige praktijk, is er een veld aangelegd zonder champost maar wel met dezelfde behandeling als de champost/specievelden van 50 cm. Om een vergelijking te kunnen maken met andere methoden, is er ook een veld aangelegd waarbij geen champost maar kunstmest is doorgemengd in een hoeveelheid die ook bij BION wordt gebruikt in de biodegradatieproeven. Als laatste is er nog een veld van 30 cm aangelegd gemengd met gestoomde champost. Dit is gebeurd om na te kunnen gaan of de eventuele effecten te danken waren aan de invloed van de schimmel of dat ook de toediening van organische stof uit de champost voldoende zou zijn om een effect op de afbraak te bewerkstelligen. In totaal zijn er zijn er zes verschillende bedden aangelegd.

De PAK-gehalten zijn direct bij de aanleg en na vier maanden gemeten. De fysische omstandigheden zijn gevolgd door iedere veertien dagen de temperatuur en de O₂-gehalten te meten. De champost was afkomstig van de champignonkwekerij van de heer Brooymans uit Hoogerheide. De Petroleumhaven-specie was een gerijpte, bijna drie jaar oude specie afkomstig van een landfarm-experiment op de Kreekraksluizen.

Het mengen van de specie met de champost is uitgevoerd op volumebasis. Daarbij is ernaar gestreefd om na menging om een 1:1-volumeverhouding te verkrijgen van de specie en de champost. Het is uitgevoerd door ± 10 cm champost over de specie te verdelen, deze vervolgens 20 cm diep te freezezen, en deze 20 cm handmatig in de velden te scheppen. De veldjes waren 1x2 meter groot. Om uitdroging van de veldjes te voorkomen zijn ze in de oorspronkelijke specie gelegd. Er is naar gestreefd om onderlinge invloed zo veel mogelijk te voorkomen, zowel fysisch als biologisch. Het heeft geleid tot de inrichting die is weergegeven in figuur 7.



Figuur 7 Inrichting van de verschillende veldjes op de Kreekraksluizen

Nadat de veldjes zijn aangelegd, zijn ze tot onderin in vijfvoud bemonsterd met een gutsboor. Na één maand (T=1), na twee maanden (T=2) en na vier maanden (T=4) zijn de velden op dezelfde wijze nogmaals bemonsterd. De monsters van T=1 en T=2 zijn ingevroren en de monsters van T=0 en T=4 zijn direct na de bemonstering geanalyseerd. De ingevroren monsters dienden als reserve om een tussenliggende waarde te kunnen bepalen als zou blijken dat er een forse (< 25%) afbraak in de bedden zou plaatsvinden. De T=2- en T=4-monsters zijn ook naar het Proefstation voor de Champignoncultuur gebracht ter beoordeling van de soort schimmel en de enzymactiviteit van die schimmel in de specie. Er zijn temperatuursensoren en zuurstofonttrekkingspunten aangebracht op verschillend diepte.



Foto 2 *Aanleg van de proefvelden op Kreekraksluizen*

5.4 Terrariumproeven met verse baggerspecie en grond van een gasfabrieksterrein

In een tweede serie monsters is evenals bij de buitenlandfarm-experimenten alleen gebruikgemaakt van champost. In plaats van de gerijpte Petroleumhaven-specie is gebruikgemaakt van niet-gerijpte baggerspecie van waterschap De Drie Ambachten. Het oorspronkelijke drogestofgehalte was 19,2%. Dit is te nat om de experimenten te kunnen starten. Daarom is de specie eerst op zogenaamd windbreekgaas gelegd dat BION normaal gebruikt om verontreinigde grond af te dekken. Het water liep hierbij met een kleine hoeveelheid slib in een opvangbak. De specie is gedurende een week elke werkdag omgescheept om het ontwateringsproces te versnellen. Vervolgens is de specie zo goed mogelijk gehomogeniseerd en zo nodig gemengd met champost (volumeverhouding 1:1, circa 30 massa%).

Een tweede gebruikte grond was afkomstig van een voormalige gasfabriek in Stadskanaal. Naast de blanco's zijn drie schimmelvarianten onderzocht. In tegenstelling tot de eerdere experimenten is ook verse champost gebruikt in verband met de te verwachten grotere activiteit.

1. Blanco
2. Bion-blanco
3. Verse compost
4. Niet-gestoomde champost
5. Gestoomde champost

HOOFDSTUK 6

RESULTATEN EN DISCUSSIE

6.1 Biodegradatie in tunnels

Groeiomstandigheden voor de schimmels

De omstandigheden in de tunnels waren tijdens het experiment goed. De temperatuur lag rond de 24° C en de zuurstof tussen de 20 en 21%. Bij het legen van de containers na 24 dagen bleek dat in het onderste deel uitdroging had plaatsgevonden. Hierin was dan ook geen schimmel meer aanwezig. Het bovenste deel van de container was goed doorgroeid met schimmel. Sommige kluiten waren extra doorgroeid. De eindbemonstering heeft alleen plaatsgevonden in het bovenste deel van de container. De extra doorgroeide kluiten zijn ook apart bemonsterd.

Afbraak PAK en minerale olie

In tabel 3 is weergegeven hoe de PAK-gehalten zijn veranderd in de tunnels. Het 95%-betrouwbaarheidsinterval is eveneens weergegeven. Een significante daling treedt op bij de champost uit container B en de gestoomde champost. Zou in plaats van voor een betrouwbaarheidsinterval van 95% zijn gekozen voor een interval van 90%, dan zou ook de daling van champost in container A significant zijn geweest. In *Pleurotus* is geen significante afbraak, evenals in de oorspronkelijke specie.

Tabel 3 *Gehalten, afname en 95%-betrouwbaarheidsinterval van de gemiddelde concentratie van de gemeten monsters*

Substraat specie	Gehalte (mg kg ⁻¹ d.s.)	T ₀	Gehalte T ₂₄ (mg kg ⁻¹ d.s.)	Afname (mg kg ⁻¹ d.s.)
PH-tunnel 1	24,1 ± 3,2		24,4 ± 1,0	0 ± 1,5
PH-tunnel 2	24,2 ± 3,2		22,1 ± 2,2	1,8 ± 1,7
Champost A	32,4 ± 10,8		25,7 ± 11,0	6,7 ± 6,8
Champost B	33,2 ± 12		19,4 ± 2,9	13,8 ± 5,5
Champost gestoomd	32,8 ± 12		23,3 ± 3,6	9,5 ± 5,5
<i>Pleurotus</i> A	32,7 ± 6,7		33,6 ± 8,5	-0,9 ± 4,9
<i>Pleurotus</i> B	30,3 ± 4,9		29,5 ± 8,5	0,8 ± 2,8
<i>Pleurotus</i> gestoomd	28,0 ± 1,2		29,5 ± 11	-1,5 ± 4,9

Champost heeft dus een positief effect op de afbraak van PAK. Dit is in overeenstemming met de verwachting die is weergegeven in figuur 5. Een extra activiteit leidt tot een snellere afbraak. Het maakt echter niet uit of er gebruik is gemaakt van champost met levende *Agaricus* of van een champost waarin de activiteit van *Agaricus* door stomen is verdwenen. In hoeverre de versnelde afbraak is veroorzaakt door een betere bodemstructuur, nutriëntenvoorziening of verhoogde aanwezigheid van opgeloste organische verbindingen, is niet nader onderzocht.

Van schimmels wordt aangenomen dat ze de hogere PAK beter kunnen aanpakken. Dit blijkt niet uit de gegevens in tabel 4, waarin onderscheid wordt gemaakt in de verschillende ringsystemen. De 5+6-ringen breken naar verhouding niet sneller af. Ook minerale olie is in deze tabel weergegeven.

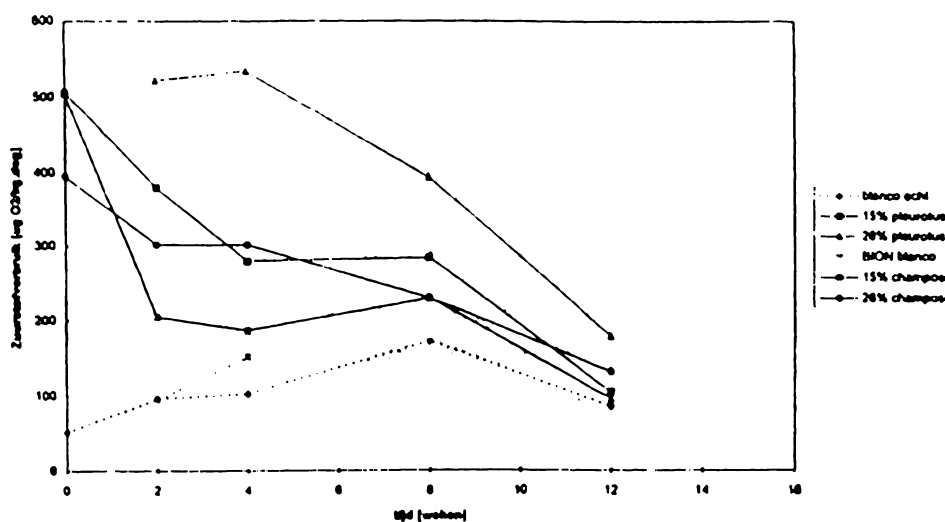
Tabel 4 *Relatieve afbraak (%) van de 2+3-, 4-, 5+6-ringen en de som van de 9 PAK van Staring gedurende de tunnelproeven*

Monster	Champost + PH-specie (tunnel 2)			Pleurotus + PH-specie (tunnel 2)			PH-specie	
	A	B	Gestoomd	A	B	Gestoomd	Tunnel 1	Tunnel 2
2+3	19,9	49,5	36,9	21,0	-2,6	-27,6	-9,1	14,2
4	32,1	46,2	28,5	11,3	10,7	-2,9	7,5	9,0
5+6	18,8	24,2	14,5	3,3	-6,6	-18,7	1,5	-4,2
9 PAK	20,6	41,7	29,0	-2,9	2,8	-5,3	0,5	8,9
Olie	2,2	4,0	1,8	10,3	22,7	20,6	-41,0	-11,5

6.2 Terrariumproeven met Petroleumhaven-specie

Groeiomstandigheden voor schimmels

De monsters zijn gedurende de gehele periode aëroob geweest. Er moet vooral in de beginperiode rekening worden gehouden met een hoger zuurstofverbruik, zoals is weergegeven in figuur 8.



Figuur 8 *Zuurstofverbruik bij de verschillende terrarium-experimenten*

De vochtvoorziening heeft ervoor gezorgd dat (in tegenstelling tot bij de tunnel-experimenten) de volledige specie gedurende de twaalf weken vochtig is gebleven. De pH-waarde van alle species lag rond de 7 [zie ook Riedstra e.a., 1997].

Door de goede omstandigheden waren beide champostvarianten al vanaf enkele dagen zichtbaar doorgegroeid. In het experiment met 26% champost was sprake van de hoogste doorgroeiing. Na drie weken was hierbij zelfs een enkele champignon te zien.

De met *Pleurotus* gemengde species waren niet zichtbaar doorgroeid (geen schimmeldraden). Wel werden er al na drie dagen knoppen zichtbaar, die na ongeveer twee weken uitgroeiden tot grote zwammen. De vruchtlichamen groeiden voornamelijk tegen de wand van het terrarium. Bij de hoogste substraatdosering waren de meeste vruchtlichamen te zien.

Afbraak van PAK en minerale olie

Bij de eerste serie zijn monsters slechts in enkelvoud geanalyseerd. Dit is te weinig om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen. Na vier weken was het PAK-gehalte in vier van de zes terraria zelfs gestegen. In tabel 5 zijn de afbraakpercentages na twaalf weken weergegeven. De betrouwbaarheid van de getallen is klein, maar is niet in tegenspraak met de resultaten van de gelijktijdig uitgevoerde tunnel-experimenten.

Tabel 5 *Afbraakpercentages van PAK en minerale olie na twaalf weken*

	Afbraakpercentage (%)	
	PAK	Minerale olie
Blanco	1	-2
BION-blanco	40	-11
15% <i>Pleurotus</i>	9	30
26% <i>Pleurotus</i>	26	9
15% champost	-25	19
26% champost	26	31

6.3 **Praktijkomstandigheden in de buitenlucht**

Groeiomstandigheden voor de schimmels

Bij de start van de proef begin juni 1997 was het warm en droog. De velden zijn ingericht onder voor de uitvoering van de proef goede weersomstandigheden. De tweede helft van juni was vrij nat met ongeveer 130 mm neerslag tegen ± 50 mm in een gemiddeld jaar. Juli was een normale maand met circa 60 mm neerslag tegen 70 mm in een gemiddeld jaar. De temperatuur bereikte in deze periode waarden die wat hoger waren dan het langjarig gemiddelde. Augustus was droger en warmer dan gemiddeld. De hoeveelheid neerslag was in augustus rond de 35 mm tegen 65 mm in een gemiddeld jaar. Met een gemiddelde temperatuur van 21°C - tegen een langjarig gemiddelde temperatuur van 17,3°C - was het de warmste augustusmaand sinds er in Nederland regelmatige temperatuurmetingen worden uitgevoerd (namelijk sinds 1706). September was erg droog met een neerslaghoeveelheid van circa 15 mm tegen een langjarig gemiddelde van circa 60 mm. De temperatuur bereikte normale waarden met een gemiddelde temperatuur van 15,8°C tegen een langjarig gemiddelde van 15,3°C.

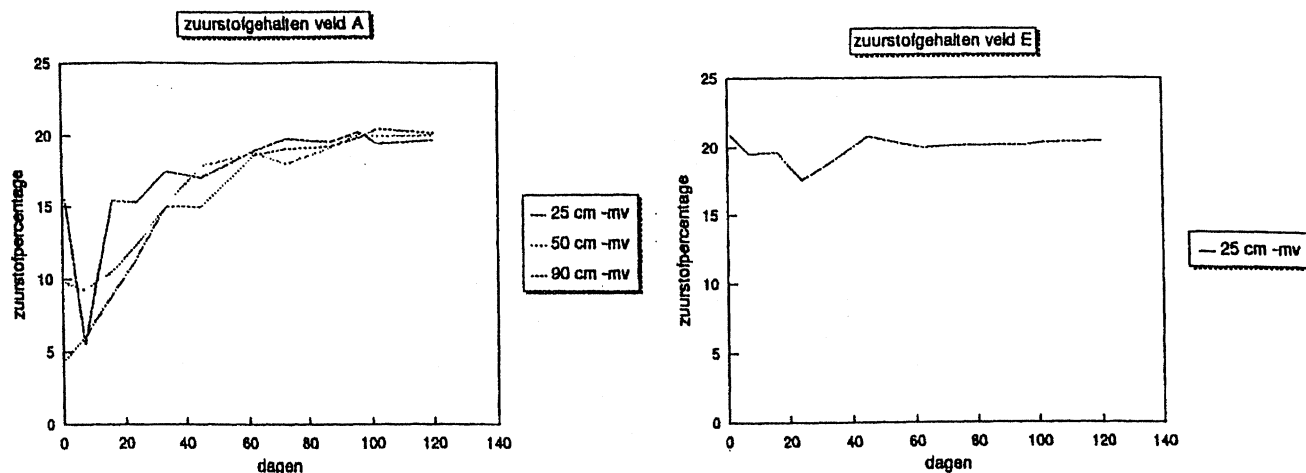
De vochtgehalten van de species zijn op drie tijdstippen gemeten (tabel 6). In juni, juli en het begin van augustus zijn de vochtgehalten hoog genoeg geweest. Hierna is uitdroging opgetreden, wat extra is gestimuleerd door de vegetatie en niet is gecompenseerd door regenval. De velden die in het begin na de aanleg niet begroeid waren, zijn in de loop van het experiment begroeid geraakt. Begin juli ontwikkelden zich grote (doorsnede 10 cm) lichtbruine paddestoelen. Na anderhalve week waren ze weer verdwenen, mede door de droogte en de warmte. In de loop van augustus kwam massaal een nachtschade-achtige tot ontwikkeling (*solanum triflorum*). Deze is blijven groeien tot in de herfst met een bedekkingspercentage van ca 95%. De vegetatie had aan het einde van het experiment nog niet te lijden van de droogte.

Tabel 6 De gemeten vochtgehalten in % van het vochtige materiaal van de veldjes A t/m F op drie tijdstippen

Veldje	Begin juni	Begin augustus	Begin oktober
A 100 cm	26,1	29,8	17,5
B 50 cm	26,7	29,6	18,1
C BION-blanco	18,9	22,2	13,4
D Blanco	19,8	22,1	14,6
E 30 cm	22,4	25,9	15,1
F 30 cm gestoomd	26,7	30,7	17,8

De temperatuur is in de meetperiode grotendeels boven de 20°C geweest. In de 100-cm- en 50-cm-velden is de temperatuur door biologische activiteit in de eerste twintig dagen nog boven de 25°C geweest. Na tachtig dagen is de temperatuur langzaam gedaald tot 15°C aan het einde van het experiment.

In de 50- en 100-cm-velden is het zuurstofgehalte in de eerste twintig dagen gedaald tot 5 tot 10%. Hierna steeg het zuurstofgehalte weer langzaam tot 21%. In de 30-cm-velden en de beide blanco's is de zuurstofdiffusie altijd voldoende geweest om volledige aërobie te handhaven. In figuur 9 zijn voorbeelden gegeven van de zuurstofgehalten.



Figuur 9 Het verloop van de zuurstofgehalten op verschillende diepten in de velden met 100 cm en 30 cm champost

Al met al zijn de omstandigheden in de bedden zodanig geweest dat de toegevoegde *Agaricus* had kunnen groeien. Dit was ook het geval in de eerste maand, omdat in deze periode vruchtlichamen zijn waargenomen. Op de lange termijn was dit echter niet meer zo. Er waren na twee en vier maanden diverse schimmels aanwezig, maar niet de *Agaricus* (tabel 7).

Tabel 7 Geïsoleerde schimmels in grondmonster genomen na twee en vier maanden

Bed Specie, behandeling	Monster twee maanden	Monster vier maanden
A 100 cm champost/specie	<i>Gliocladium virens</i> * <i>Rhizopolus stolonifer</i>	alleen <i>G. virens</i>
B 50 cm champost/specie	<i>G. virens</i> <i>Doratomyces</i> <i>D. stemonitis</i>	<i>G. virens</i> <i>D. stemonitis</i> <i>Micor sp.</i>
C BION-blanco	<i>G. virens</i> <i>D. stemonitis</i>	<i>R. stolonifer</i> <i>G. virens</i> <i>Penicillium sp.</i>
D Blanco	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Mucor sp.</i>?	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Mucor sp.</i>?
E 30 cm champost/specie	<i>G. virens</i>	<i>G. virens</i> <i>R. stolonifer</i> <i>T. harzianum</i>
F 30 cm gestoomde champost/specie	<i>R. stolonifer</i>	<i>R. stolonifer</i> <i>T. harzianum</i>

* *Gliocladium virens* wordt sinds kort *Trichoderma virens* genoemd.

.....? = niet-determineerbare schimmel vanwege infectie met *T. harzianum*.

De toevoeging van de champost had een positief effect op de structuur van de baggerspecie. De ontwikkelde grond was duidelijk ruller en zou kunnen worden toegepast als grond waarop beplanting noodzakelijk is, zoals de afdeklaag van een geluidswal of dijklichaam. De verkregen grond is ook goed geschikt voor de toepassing van extensieve landfarming, al dan niet in combinatie met de teelt van biomassa voor de energievoorziening. Door de aanwezigheid van veel nutriënten ligt gebruik bij natuurontwikkeling minder voor de hand.

Afbraak PAK en minerale olie

Aan het begin en na vier maande zijn de verschillende bedden bemonsterd en zijn de monsters geanalyseerd om te onderzoeken wat de afbraak van PAK en minerale olie is geweest in de proefperiode. De resultaten van deze bemonstering en analyse staan in tabel 8. Als de vermindering van het PAK-gehalte van de verschillende bedden worden vergeleken, valt het volgende op:

- Uitgezonderd in bed A heeft in alle bedden PAK-afbraak plaatsgevonden.
- De spreiding in de afname is groot.
- De specie met de ongestoomde champost lijkt het beter te doen dan de specie met de gestoomde champost
- Ook de blanco en de BION-blanco vertonen afbraak.
- De specie in de bedden met het hoogst PAK-gehalte op T=0 vertonen de grootste afname.

De cijfers tonen aan dat er nog steeds PAK-afbraak plaatsvindt. Er blijkt echter niet uit dat champost een extra stimulans is voor de afbraak. Wat voor de endogene populatie niet afbreekbaar is (circa 23 mg kg⁻¹ d.s.) in de meetperiode, is ook voor de schimmel niet afbreekbaar. In alle gevallen is de verdeling over de ringsystemen van de verwijderbare PAK vergelijkbaar (tabel 9). Afbraak vindt plaats over alle ringsystemen. In die gevallen waarbij het PAK-gehalte hoger is (veld B en veld E), ligt dat aan een verhoogd gehalte van de 4-ringen. In alle gevallen is de samenstelling aan het einde van het

experiment vergelijkbaar en kan worden gesteld dat toevoeging van schimmel niet heeft geleid tot een extra verlaging van het gehalte zware PAK (5+6 ringen).

Tabel 8 *PAK-gehalten aan het begin en na vier maanden met het daarbij horende 95%-betrouwbaarheidsinterval en de afname in % van het begingehalte (9 van Staring)*

Bed specie, behandeling	Gehalte T=0 mg. kg ⁻¹ d.s.	Gehalte T=4 mg. kg ⁻¹ d.s.	Afname in %
A 100 cm champost/specie	29,0 ± 4,4	30,9 ± 6,1	- 6,5 ± 25,8
B 50 cm champost/specie	34,8 ± 6,5	24,4 ± 5,2	29,8 ± 24,1
C BION-blanco	26,3 ± 9,1	21,7 ± 4,4	17,5 ± 47,5
D Blanco	26,9 ± 7,1	23,4 ± 3,9	13,0 ± 37,5
E 30 cm champost/specie	30,9 ± 9,0	22,7 ± 3,5	26,5 ± 38,5
F 30 cm gestoomde champost/specie	25,5 ± 1,5	22,6 ± 4,2	11,4 ± 23,1

Tabel 9 *De verdeling van de PAK-componenten over de ringsystemen van de zes onderzochte veldjes in het begin en aan het eind van de proef*

Veldje	Ring	Concentratie met 95%-betrouwbaarheidsinterval	Concentratie met 95%-betrouwbaarheidsinterval
A	2+3	12,5 ±2,7	±14,2 ±1,7
	4	16,0 ±4,0	15,5 ±4,6
	5+6	13,4 ±2,4	13,5 ±2,0
B	2+3	14,4 ±3,5	11,2 ±2,6
	4	20,4 ±3,7	11,6 ±2,6
	5+6	15,4 ±1,7	13,0 ±1,5
C	2+3	11,8 ±6,6	10,7 ±1,7
	4	14,5 ±2,2	11,4 ± 3,2
	5+6	13,0 ±1,4	12,1 ±2,1
D	2+3	10,7 ±5,3	9,8 ±2,2
	4	15,4 ±6,5	10,3 ±4,0
	5+6	12,6 ±2,8	11,0 ±1,2
E	2+3	13,4 ±6,3	10,4 ±2,8
	4	18,0 ±6,6	12,0 ±2,0
	5+6	14,4 ±3,2	12,4 ±1,2
F	2+3	10,9 ±1,9	10,1 ±3,0
	4	14,0 ±5,5	10,5 ±2,3
	5+6	12,7 ±1,6	11,1 ±1,1

De gehalten aan minerale olie van de specie in de verschillende bedden zijn direct na de aanleg van de bedden en na vier maanden gemeten. De gemeten gehalten zijn gegeven in tabel 10. De gehalten zijn ook hier omgerekend naar de werkelijke gehalten in de PH-specie, om te voorkomen dat een relatief groot aandeel champost in het monster het minerale-oliegehalte extra zou verlagen (verdunningseffect).

De afname van het gehalte aan minerale olie in de verschillende bedden lijkt het beeld te volgen dat bij de afname van PAK is verkregen. Er is in bijna alle velden sprake van enige vermindering, maar de spreiding in de afname is ook hier groot. In tegenstelling met de afname van PAK heeft er praktisch geen afname van minerale olie plaatsgevonden in de blancovelden.

Tabel 10 *Gehalten aan minerale olie aan het begin en na vier maanden met het daarbij horende 95%-betrouwbaarheidsinterval en de afname in % van het beginghalte*

Bed specie, behandeling	Gehalte T=0 mg. kg ⁻¹ d.s.	Gehalte T=4 mg. kg ⁻¹ d.s.	Afname in %
A 100 cm champost/specie	2457 ± 480	2409 ± 526	2,0 ± 30,0
B 50 cm champost/specie	3119 ± 552	2707 ± 96	13,2 ± 18,0
C BION-blanco	2152 ± 275	2120 ± 96	1,5 ± 13,5
D Blanco	2449 ± 209	2231 ± 143	8,9 ± 10,3
E 30 cm champost/specie	2230 ± 415	1934 ± 227	13,3 ± 21,2
F 30 cm gestoomde champost/ specie	1999 ± 229	2102 ± 222	-5,1 ± 15,9

6.4 Terrariumproeven met verse baggerspecie en grond van een gasfabrieksterrein

Groeiomstandigheden voor schimmels

De ontwatering van de baggerspecie ging tijdens de reiniging door. Bij beide blanco's vond binnen twee weken inklinking plaats tot een harde onhandelbare massa waarin geen sprake meer was van een goede zuurstofvoorziening. Dit is in overeenstemming met de ervaring van SC-DLO dat ontwateren alleen onvoldoende is en dat ook rijping nodig is. Dit laatste is een langdurig en natuurlijk proces. Inklinking vond bij de champost minder snel plaats. Bij de bemonstering na vier maanden bleek gezien de vele kleinere klonten dat de ontwaterde specie niet optimaal met het entmateriaal was gemengd. Door de inklinking en scheurvorming was de zuurstofconsumptie niet te meten. In de grote scheuren is de zuurstofvoorziening optimaal, en dit wordt gemeten. Dat in de rest van de specie geen zuurstof komt, wordt niet gemeten. Visuele beoordeling van de monsters gaf aan dat de aërobie niet optimaal is geweest.

De grond van de gasfabriek is met 1 liter water per week geïrrigeerd. De blanco's hadden een lage pH (2,9). Bij de BION-blanco is kalk door de grond gemengd. Hierdoor steeg de pH tot 5,6. De zuurgraad bij de champost variant lag rond de pH 6. De pH van de oorspronkelijke grond kan beperkend zijn geweest. Toevoeging van kalk zorgt er wel voor dat de gemiddelde pH van de grond omhooggaat, maar op aggregaatsniveau kan nog steeds sprake zijn van een lage pH.

Afbraak van PAK en minerale olie

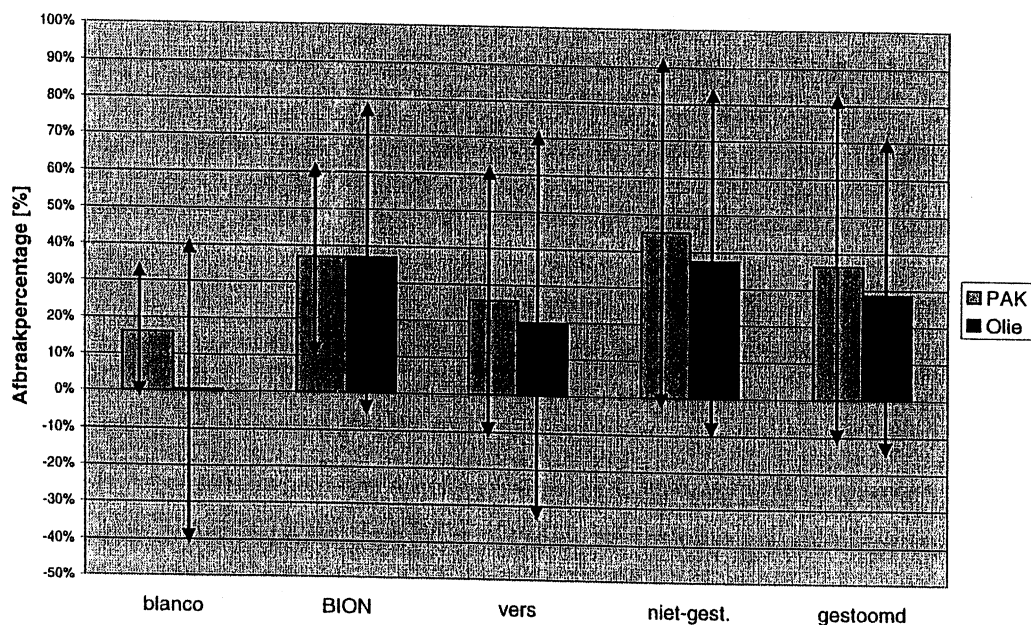
Baggerspecie

In de baggerspecie vond er gedurende het ontwateren al daling plaats van de gehalten van PAK en minerale olie. PAK (10 van Vrom) daalde van 1600 tot 700 mg/kg d.s. en minerale olie van 5200 tot 3500 mg/kg d.s. Na het drogen is de specie gemengd met champost of nutriënten. Deze specie is bemonsterd en gezien als het monster dat bij T=0 behoort. De resultaten hiervan en de metingen na vier maanden zijn weergegeven in tabel 11. In deze tabel staat tevens de berekende afbraak met het daarbij behorende betrouwbaarheidsinterval weergegeven.

Tabel 11 De afbraak van PAK en minerale olie van baggerspecie uit De Drie Ambachten (gehalten en afname zijn gegeven met het daarbij behorende 95%-betrouwbaarheidsinterval)

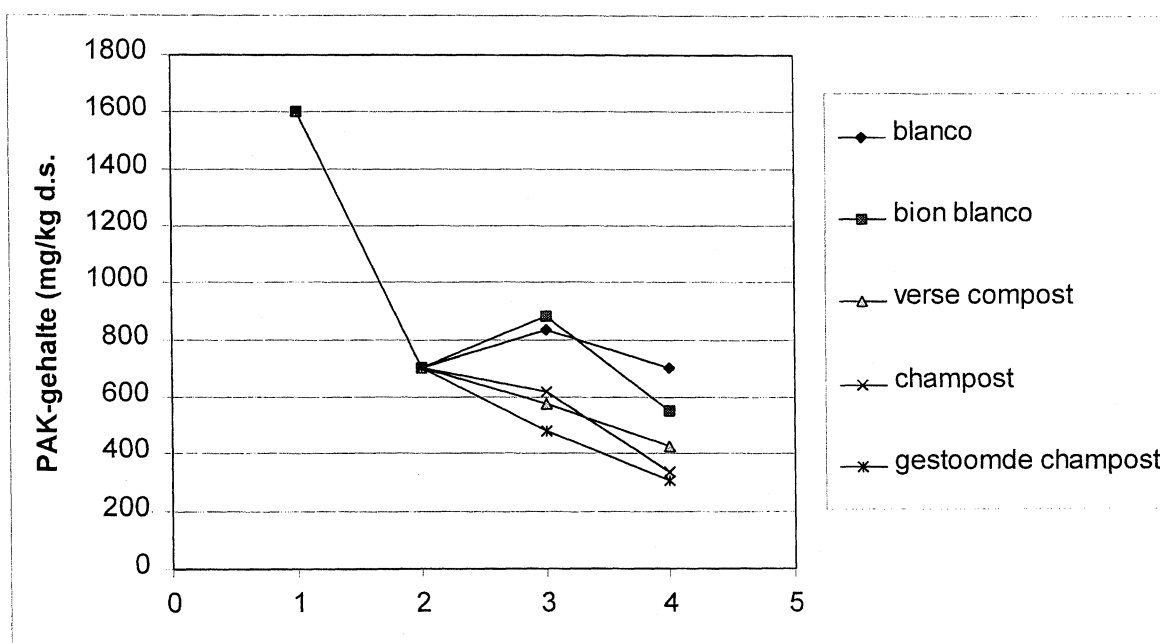
	Eenheid	Blanco	BION-blanco	Verse compost	Niet-gestoomd	Gestoomd
PAK, start	mg/kg d.s.	834 ± 89	880 ± 179	576 ± 109	617 ± 236	483 ± 223
PAK t=4 mnd	mg/kg d.s.	700 ± 108	555 ± 145	428 ± 183	338 ± 168	308 ± 40
Afname	%	16,0 ± 16,8	36,9 ± 26,1	25,7 ± 36,9	45,2 ± 47,0	36,3 ± 46,8
Olie, start	mg/kg d.s.	4067 ± 1026	4623 ± 1391	2977 ± 863	3335 ± 1047	2735 ± 965
Olie, t=4 mnd	mg/kg d.s.	4041 ± 1308	2913 ± 1353	2395 ± 1302	2087 ± 1169	1954 ± 649
Afname	%	0,6 ± 40,9	37,0 ± 42,0	19,6 ± 52,5	37,4 ± 47,1	28,6 ± 42,5

De afbraakresultaten zijn ook weergegeven in figuur 10, waaruit kan worden geconcludeerd dat de afbraak bij alle monsters met uitzondering van de blanco vergelijkbaar is. De verminderde afbraak bij de blanco is veroorzaakt door de minder optimale zuurstofvoorziening. Het is hier niet terecht om te concluderen dat de toevoegingen hebben gezorgd voor een verbeterde afbraak. Waarschijnlijker is dat het mengen heeft gezorgd voor een betere aërobie.



Figuur 10 Afname PAK en minerale olie in baggerspecie van De Drie Ambachten bij de afbraakexperimenten bij BION

Het effect van de toevoeging van champost moet worden gezien in het gehele traject van de biologische afbraak. Dit is gedaan in figuur 11. Het oorspronkelijke gehalte van de specie is hier als eerste weergegeven (waarde 1 op de X-as). Het volgende gehalte is het gehalte dat is verkregen na droging (X=2). Menging zorgt vervolgens voor een verdere daling in het met champost gemengde monster (X=3). Pas het traject tussen X=3 en X=4 is gemeten bij de experimenten. De gemeten daling is klein in vergelijking met de totale daling. Deze figuur kan worden vergeleken met figuur 3 en 4. Duidelijk is dat biologisch goed beschikbare PAK al verdwijnt tijdens de ontwatering en dat hier weinig moeite voor hoeft te worden gedaan.



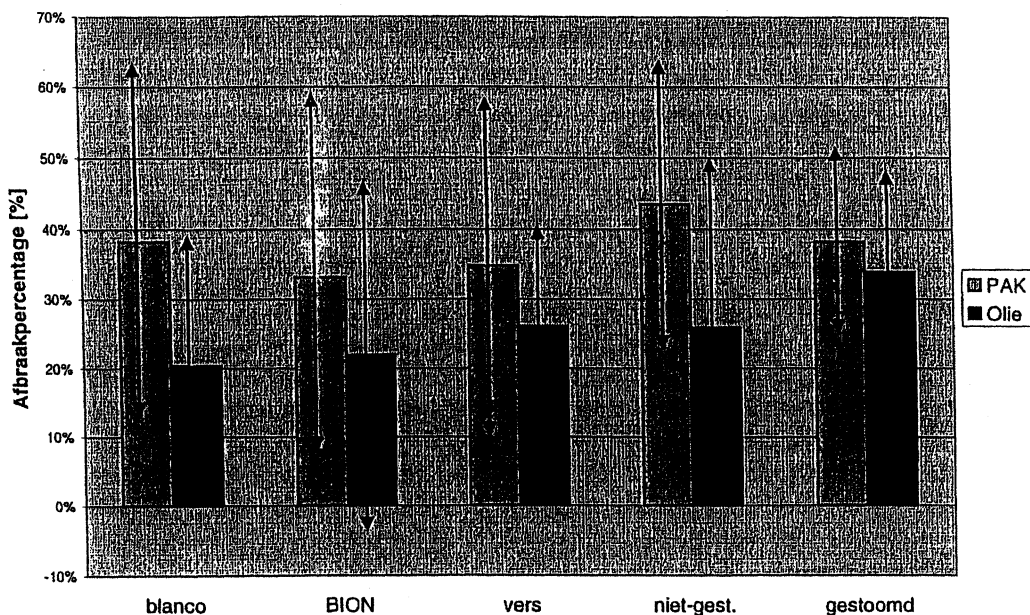
Figuur 11 De daling van het PAK-gehalte tijdens de verschillende behandlungsstappen van baggerspecie van De Drie Ambachten - X=1: oorspronkelijk gehalte; X=2: gehalte na ontwateren; X=3: gehalte na menging; X=4: gehalte aan het einde van het experiment (T=4 maand)

Grond gasfabrieksterrein

De afname van PAK en minerale olie in de grond van het gasfabrieksterrein is vergelijkbaar met de baggerspecie weergegeven in tabel 12 en figuur 12. Ook nu zijn er geen verschillen waarneembaar in de afbraak. Nu is ook de blanco vergelijkbaar, omdat de aërobie over het grootste deel van de vier maanden goed is geweest. In deze grond is de restconcentratie relatief hoog. De schimmels zijn niet in staat geweest om deze restfractie beter aan te pakken.

Tabel 12 De afbraak van PAK en minerale olie van grond gasfabrieksterrein (gehalten en afname zijn gegeven met het daarbij horende 95%-betrouwbaarheidsinterval)

	Eenheid	Blanco	BION-blanco	Verse compost	Niet-gestoomd	Gestoomd
PAK, start	mg/kg d.s.	41,8 ± 10,2	40,8 ± 9,7	36,3 ± 5,0	37,6 ± 3,4	37,3 ± 4,8
PAK t=4 mnd	mg/kg d.s.	25,8 ± 2,6	27,3 ± 3,9	23,7 ± 7,3	21,2 ± 3,7	23,0 ± 1,7
Afname	%	38,2 ± 25,2	33,1 ± 25,5	34,8 ± 24,4	43,5 ± 20,5	38,3 ± 13,6
Olie, start	mg/kg d.s.	1943 ± 320	1892 ± 423	1846 ± 256	1794 ± 347	1848 ± 207
Olie, t=4 mnd	mg/kg d.s.	1546 ± 183	1475 ± 210	1364 ± 111	1329 ± 249	1221 ± 170
Afname	%	20,4 ± 19,0	22,0 ± 25,0	26,1 ± 15,1	25,6 ± 23,8	33,9 ± 14,5



Figuur 12 Afname PAK en minerale olie in grond van het gasfabrieksterrein bij de afbraakexperimenten bij BION

HOOFDSTUK 7

CONCLUSIES

PAK en minerale olie in vervuilde grond en baggerspecie zijn goed biologisch afbreekbare verontreinigingen. Uitgaande van een aërobe situatie en de endogene microbiële populatie vindt er afbraak plaats. Probleem in de praktijk is dat niet alle verontreiniging direct biologisch beschikbaar is en dat er daarom een restconcentratie overblijft die slechts langzaam wordt afgebroken. Schimmels hebben een extracellulair enzymstelsel en zouden daarom de afbraak van PAK en minerale olie kunnen versnellen. Er komen verschillende schimmels in aanmerking voor stimulering van de afbraak, waarvan de *Phanerochaete chrysosporium* en de *Bjerkandera sp. BOS55* de bekendste zijn. Om schimmels te kunnen inzetten, is de beschikbaarheid ook een belangrijk punt. Bij de teelt van eetbare paddestoelen komen grote hoeveelheden substraat vrij, die op een goedkope manier kunnen worden ingezet bij de reiniging van vervuilde grond. De hierbij gebruikte schimmels *Agaricus* en *Pleurotus* hebben een extracellulair enzymstelsel dat z'n nut kan hebben bij de afbraak van PAK en minerale olie in verontreinigde baggerspecie en gronden.

In dit onderzoek is nagegaan of de substraten uit de teelt van paddestoelen kunnen worden ingezet bij de reiniging van baggerspecie en grond. Bij de opzet van de verschillende onderzoeken is als uitgangspunt genomen dat schimmels de specie of grond beter moeten kunnen reinigen dan de endogene populatie. Toevoeging van een substraat is immers een kostenverhogende factor bij de reiniging.

De conclusies over de praktische mogelijkheden voor de toepassing van *Agaricus* en *Pleurotus* zijn gebaseerd op in deze rapportage samengevat onderzoek. Het onderzoek heeft plaatsgevonden onder zeer gecontroleerde omstandigheden bij het Proefstation voor de Champignoncultuur, op een wijze die direct vertaalbaar is voor biologische reiniging in een hal bij BION en op een buitenlocatie voor onderzoek van landfarming op Kreekraksluizen.

7.1 Activiteit van de toegevoegde schimmel

Essentieel bij de toepassing van schimmels is de overleving van de schimmel en de doorgroeiing van de te reinigen specie of grond. Uitgaande van een ontwaterde baggerspecie waarin al voldoende ontwatering en rijping was opgetreden, de gekozen mengverhouding en de goed controleerbare omstandigheden bij het proefstation, kunnen de schimmels groeien. Dezelfde specie toegepast in het systeem van BION leidde ook tot een goede doorgroeiing. Menging van de schimmel met al ontwaterde en gerijpte baggerspecie in een buitenlandfarm gaf echter geen schimmel die langdurig actief was, ondanks een gemiddeld goede vocht- en zuurstofhuishouding. In een buitensituatie is de concurrentie van andere micro-organismen zodanig dat de toegevoegde schimmel niet kan overleven. Deze concurrentie wordt waarschijnlijk extra gestimuleerd doordat de omstandigheden tijdelijk, bijvoorbeeld als gevolg van een regenbui, minder optimaal zijn voor de schimmels.

Bij minder optimale omstandigheden, zoals die optraden bij een wel ontwaterde maar niet gerijpte baggerspecie en een zure grond van een gasfabriekterrein, bleek de schimmel ook bij de BION-experimenten niet actief.

Toevoeging van een substraat met actieve schimmels met als doel grote schimmelactiviteiten in verontreinigde grond of baggerspecie te verkrijgen, vereist groei van de schimmel. Hiervoor zijn goed beheersbare omstandigheden nodig. Als er met minder optimale omstandigheden wordt gewerkt, leidt dat ertoe dat de gewenste schimmels verdwijnen. Toepassing van schimmeltechnologie lijkt daarom kansrijker in een gecontroleerde hal dan in een buitensituatie. Ook in een hal moet men echter blijven voldoen aan de gewenste groeiomstandigheden van de schimmel.

7.2 Afbraak van PAK en minerale olie

Om de afbraak vast te stellen was een uitgebreide bemonstering noodzakelijk om een statistisch verantwoorde uitspraak te kunnen doen. Bij de opzet van de experimenten is rekening gehouden met de activiteit van de endogene populatie en het feit dat een extra activiteit in de meeste gevallen leidt tot stimulatie van de biologische activiteit. In alle onderzochte situaties waarin sprake was van een actieve schimmel, kon niet worden aangetoond dat de onderzochte schimmels *Agaricus* en *Pleurotus* een extra stimulerend effect hebben op de afbraak. De afbraak was gelijk aan de afbraak die werd veroorzaakt door de endogene microbiële populatie.

Toevoeging van een substraat heeft wel een positief effect op de snelheid van de afbraak. Dit werd geconstateerd bij zowel toevoeging van substraat met actieve schimmel al bij substraat waarbij de schimmel was gedood door stomen. Of dit wordt veroorzaakt door de menging, de betere nutriëntenvoorziening, de betere structuur of de aanwezigheid van opgeloste organische stof is niet nader onderzocht.

Toevoeging van champost heeft een positief effect op de structurele kwaliteit van de te reinigen grond of baggerspecie. Dit zou kunnen worden gebruikt bij de extensieve behandeling van verontreinigde grond en baggerspecie. Door de verbeterde structurele eigenschappen zal een gewas zich beter kunnen ontwikkelen in gronden die zijn gemengd met champost. Dit kan leiden tot een verbeterd extensief proces.

Toevoeging van een substraat dat afkomstig is van de teelt van eetbare paddestoelen aan een verontreinigde baggerspecie of grond, heeft een positief effect op afbraak van PAK en de bruikbaarheid van het eindproduct. Het zijn echter niet de schimmels die verantwoordelijk zijn voor de afbraak. De schimmels *Agaricus* en *Pleurotus* zorgen in vergelijking met de al aanwezige endogene microbiële populatie niet voor een verbeterde afbraak van PAK en minerale olie. Voor het eindproduct zijn er kansen voor toepassingen waar gewassen op gereinigde grond of baggerspecie moeten groeien.

SPOOR 2

PCB'S, HCH, DDT EN DIOXINEN

fase 1b: Laboratoriumonderzoek

W.A. Traag, T. Zuidema, H.J.M. op den Camp, A. Pol, L.J.L.D. van Griensven en J.P.G. Gerrits

SAMENVATTING

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

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

HOOFDSTUK 8

INLEIDING

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

8.1 Metingen van enzymactiviteiten

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

- *Lignineperoxidase (ligninase, LiP)*. LiP kan vanwege zijn hoge redoxpotentiaal zowel fenolische als niet-fenolische ligninecomponenten oxideren. Het enzym wordt beschouwd als de sleutelcomponent van het ligninolytisch systeem vanwege zijn rol bij de oxidatie van niet-fenolische aromatische eenheden.
- *Mn-peroxidase (MnP)*. Het mangaan-afhankelijke peroxidase (MnP) katalyseert de oxidatie van Mn^{2+} door H_2O_2 , waarbij het gevormde Mn^{3+} vervolgens verscheidene fenolische lignineverbindingen oxideert via fenoxylradicalen. Non-fenolische componenten worden, vanwege de lagere redoxpotentiaal van MnP ten opzichte van LiP, niet afgebroken door MnP.
- *Laccase*. Laccase is een 'blue copper'-oxidase dat de 1-elektronoxidatie van fenolen en fenolische lignine structuren (via fenoxylradicalen) katalyseert, waarbij uiteindelijk vier elektronen worden overgedragen op O_2 en water wordt gevormd. De 1-elektronoxidatie heeft onder andere C_7 -oxidatie en aryl-alkylsplijting tot gevolg. Daarnaast is ook een ringsplijtsend effect van het enzym aangetoond.

8.2 Bepaling respiratiesnelheden en optimalisering van incubaties

Om succesvolle incubaties met verontreinigde grond uit te kunnen voeren, is het zinvol om een indruk te hebben van de endogene microbiële activiteit in zowel de entmaterialen als de verontreinigde grond en in de factoren die deze activiteit beïnvloeden. Bij proefincubaties kan ook de ontwikkeling van

microbiële en enzymactiviteit in de tijd worden gevolgd. Een van de bepalende parameters voor incubaties over een langere tijdsperiode is het vochtgehalte.

8.3 Incubaties onder optimale condities gedurende twee maanden

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

HOOFDSTUK 9

UITVOERING

9.1 Bereiding van mengsels (uitgevoerd door het Proefstation)

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

Als entmaterialen zijn gebruikt 'champost' (residu teelt *Agaricus bisporus*) en *Pleurotus*-teeltresidu, beide zowel onbehandeld als gestoomd. Voor het mengen met de vervuilde grond worden de materialen eerst gehomogeniseerd met een cutter. Een volume van 2,5 liter grond wordt vervolgens gemengd met een gelijk volume entmateriaal. Van elk mengsel is de gewichtsverhouding grond-entmateriaal bepaald (tabel 13). De mengsels zijn gemaakt op 7 oktober 1997 en meteen in de koelcel geplaatst. De mengsels zijn op 21 oktober 1997 naar Nijmegen gebracht. Van elk mengsel en van de vervuilde grond is een monster van 100 g genomen en ingevroren voor analyses door het RIKILT. Behalve de vier grond-entmateriaalmengsels zijn ook de afzonderlijke componenten beschikbaar voor metingen.

Tabel 13 Gewichtsverhouding mengsels

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

9.2 Bepaling metabole activiteit

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

9.3 Meting van enzymactiviteiten

Aan 10 g monster (grond, entmateriaal of mengsel) wordt 15 ml water toegevoegd. Vervolgens wordt er twintig minuten geschud bij 150 rpm. Na centrifugatie (twintig minuten, 30.000 x g) wordt het heldere supernatant gebruikt voor enzymmetingen. De laccase-activiteit wordt bepaald aan de hand van de oxidatie van N,N-dimethyl-phenylenediamine tot een rood quinonproduct, dat spectrofotometrisch bepaald kan worden bij 552 nm. Mn-afhankelijke peroxidase-activiteit wordt bepaald met phenolrood. De oxidatie van deze verbinding kan worden gevolgd bij 431 nm. De ligninase-activiteit wordt bepaald

aan de hand van de oxidatie van de kleurstof Azure B, die wordt weerspiegeld door een afname van de extinctie bij 615 nm.

9.4 Opstelling voor de incubatie gedurende twee maanden

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

9.5 Bepaling van het gehalte aan gechlloreerde verbindingen

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

- verontreinigde grond gemengd met champost op tijdstip nul maanden in vijfvoud;
- verontreinigde grond gemengd met champost op tijdstip twee maanden in vijfvoud;
- verontreinigde grond gemengd met *Pleurotus*-residu op tijdstip nul maanden in vijfvoud;
- verontreinigde grond gemengd met *Pleurotus*-residuen op tijdstip twee maanden in vijfvoud.

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

- verontreinigde grond op tijdstip nul maanden in enkelvoud;
- verontreinigde grond gemengd met champost op tijdstip nul maanden doodgestoomd in enkelvoud;
- verontreinigde grond gemengd met *Pleurotus*-residu op tijdstip nul maanden doodgestoomd in enkelvoud.

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

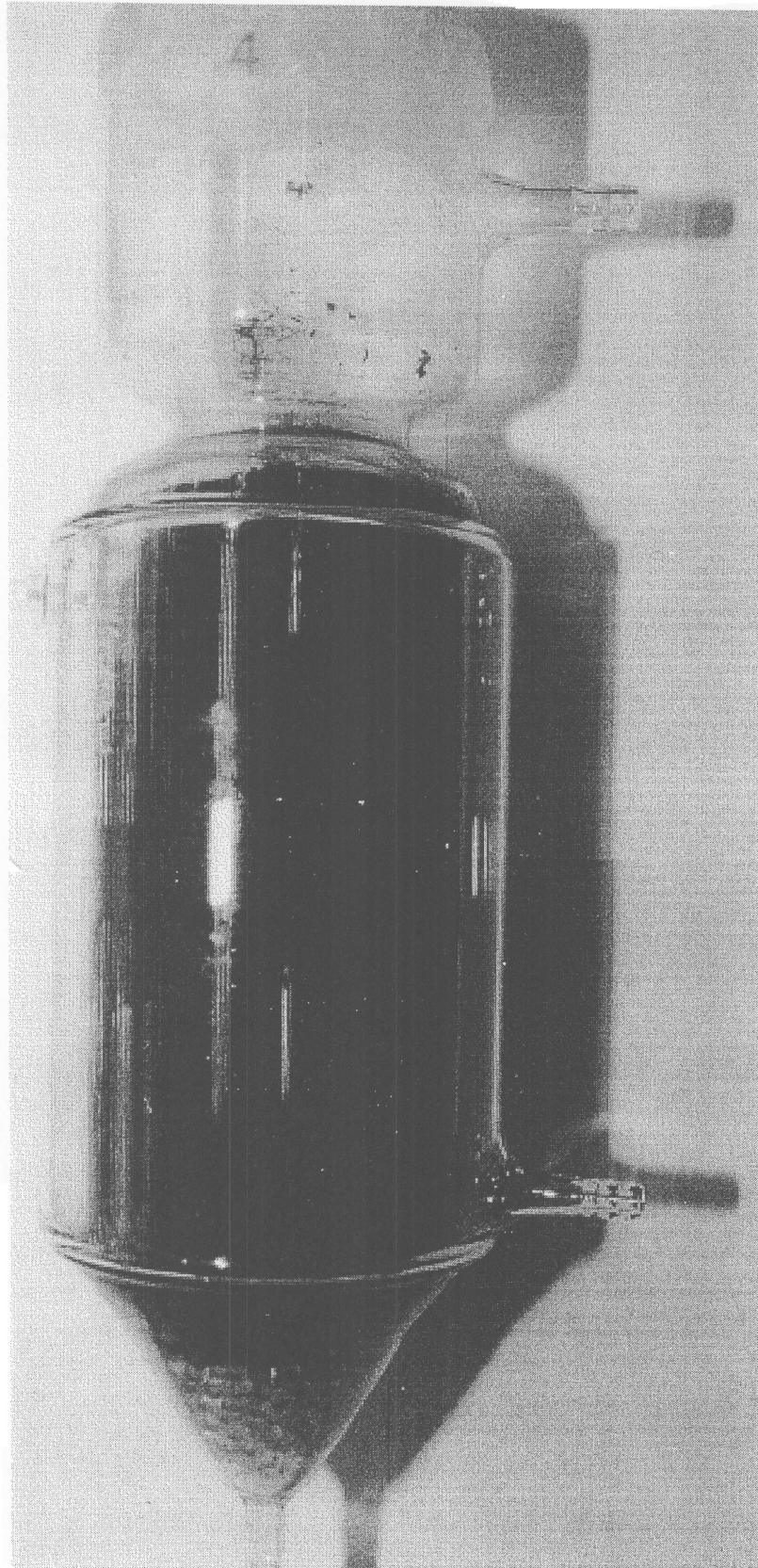
- blanco grond;
- blanco grond gespiked met HCH's, DDT's, PCB's en dioxinen in viervoud.

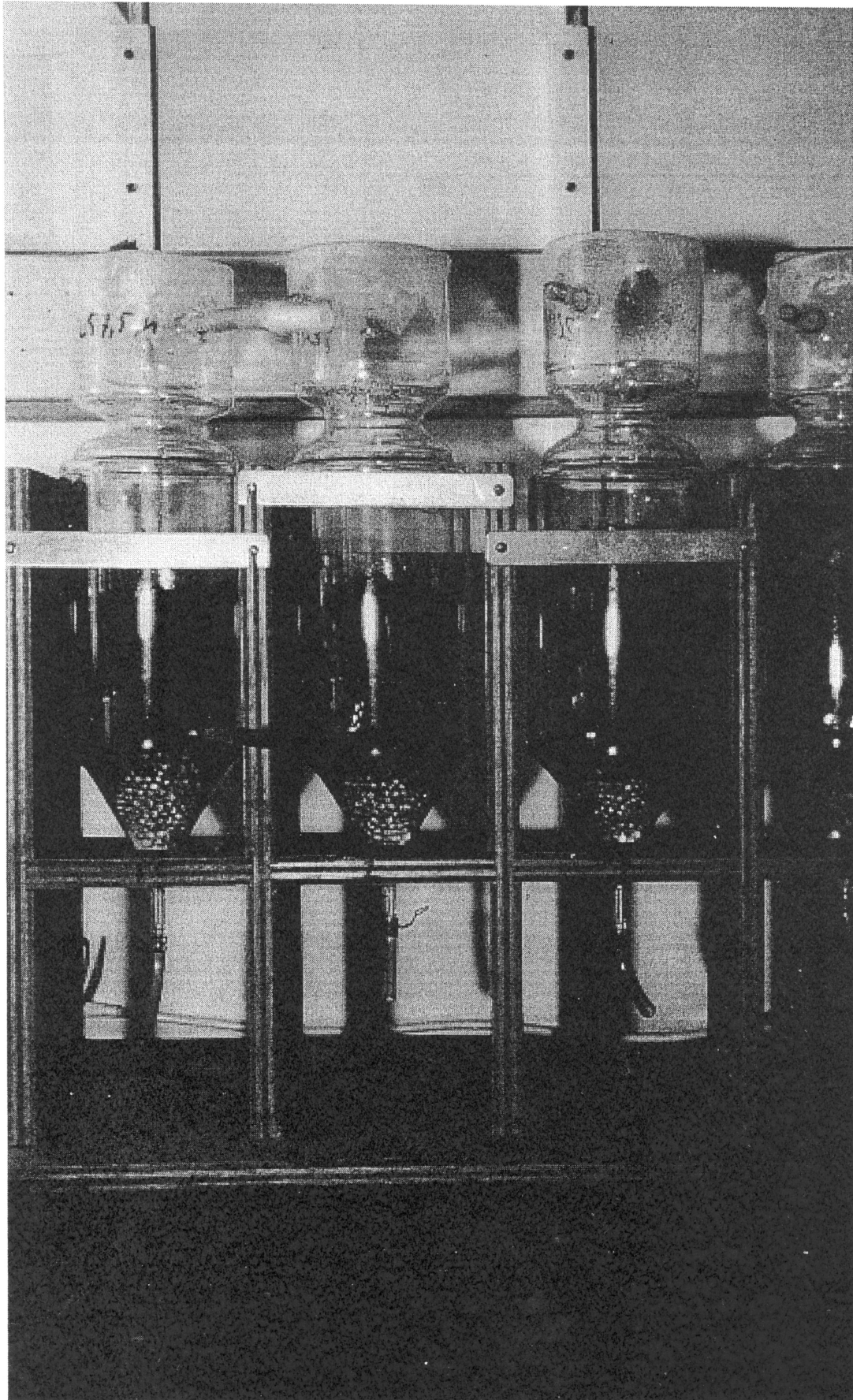
Na homogenisering van de monsters is een deel in bewerking genomen conform NEN-norm 5734. Om het kwantitatieve aspect zo goed mogelijk uit te voeren, is gebruikgemaakt van de zogenaamde isotoop-verdunningsmethode. Aan het te onderzoeken monster is een exact bekende hoeveelheid van een gelabelde verbinding toegevoegd. Aangenomen wordt dat deze gelabelde verbinding zich fysisch/chemisch identiek gedraagt aan de te onderzoeken verbinding, waardoor er per monster aan de hand van de respons van de gelabelde verbinding eenvoudig kan worden gecorrigeerd voor eventuele verliezen van de te bepalen componenten. Uit iedere groep van de te analyseren componenten is minimaal één gelabelde interne standaard toegevoegd. Voor de bepaling van de dioxinen zijn vijftien gelabelde interne standaarden toegevoegd.

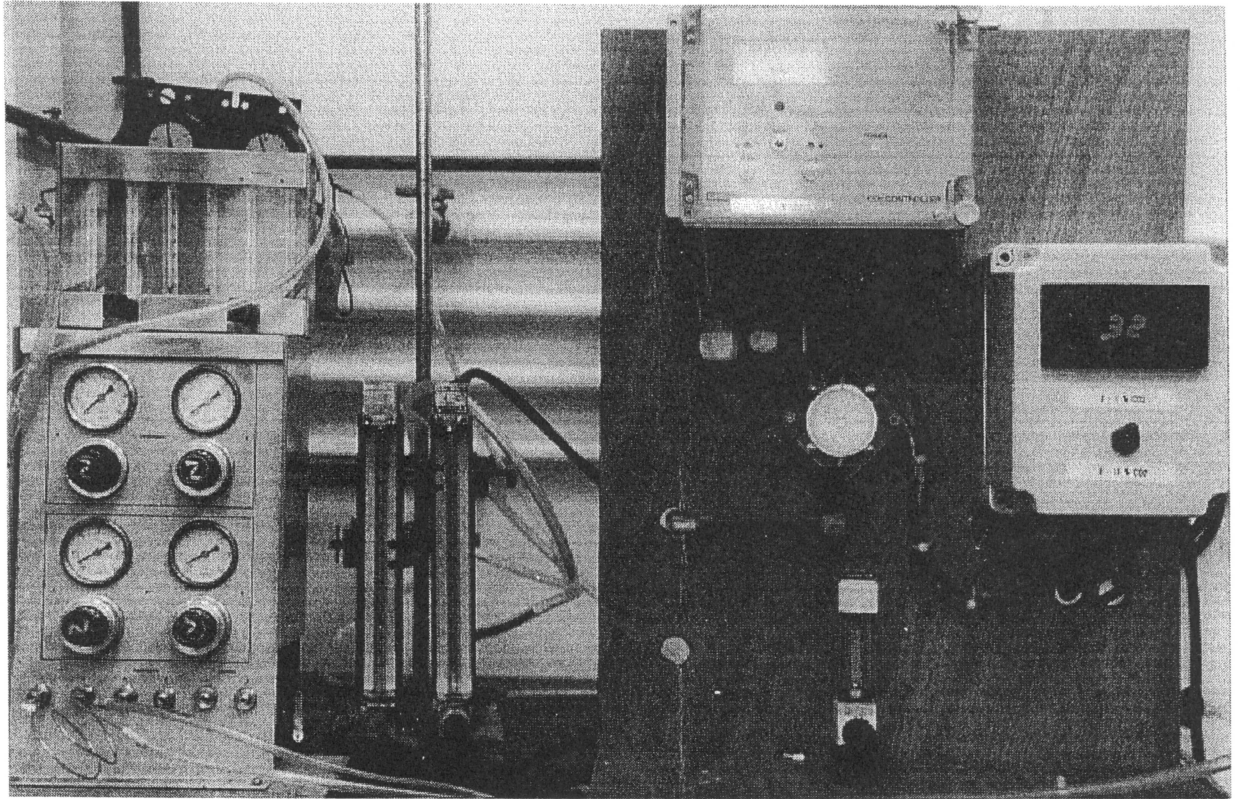
Na extractie met een organisch oplosmiddel conform NEN 5734 is het extract na concentreren gezuiverd met gelpermeatie-chromatografie (GPC), waarbij een scheiding plaatsvindt op grond van

molecuulgrootte. De fractie die de te bepalen componenten bevat, is uitgevangen en na concentratie is een aliquot geanalyseerd met gaschromatografie en hoogoplossend-vermogenmassaspectrometrie. Dit aliquot is driemaal geanalyseerd onder verschillende massaspectrometrische instellingen voor respectievelijk de HCH's, DDT's en PCB's. Vervolgens is de rest van het geconcentreerde extract verder gezuiverd over een koolkolom. Hierbij wordt een scheiding bewerkstelligd tussen dioxinen en de andere organische microverontreinigingen. De dioxinen bevattende fractie is ten slotte drooggedampt en opgenomen in 10 μ l toluen en geanalyseerd met gaschromatografie en hoogoplossend-vermogenmassaspectrometrie.

Opstellingen schimmel-experimenten in het laboratorium van de KUN







HOOFDSTUK 10

RESULTATEN

10.1 Droge-stofanalyses

Op de grond, de entmaterialen en de mengsels is een droge-stofanalyse uitgevoerd. Vervolgens zijn de monsters verast (vier uur, 550°C) om het organische-stofgehalte vast te stellen (tabel 14). De waarden voor de mengmonsters (2 t/m 5) zijn berekend aan de hand van de analyses van de individuele componenten (1 en 6 t/m 9) en de gegevens uit tabel 13. Door het mengen van de grond met de entmaterialen, die hoge gehalten organische stof bevatten, wordt in de mengsels een organisch-stofgehalte van 17 tot 22% bereikt. Dit is ongeveer een verdrievoudiging van het gehalte ten opzichte van de vervuilde grond.

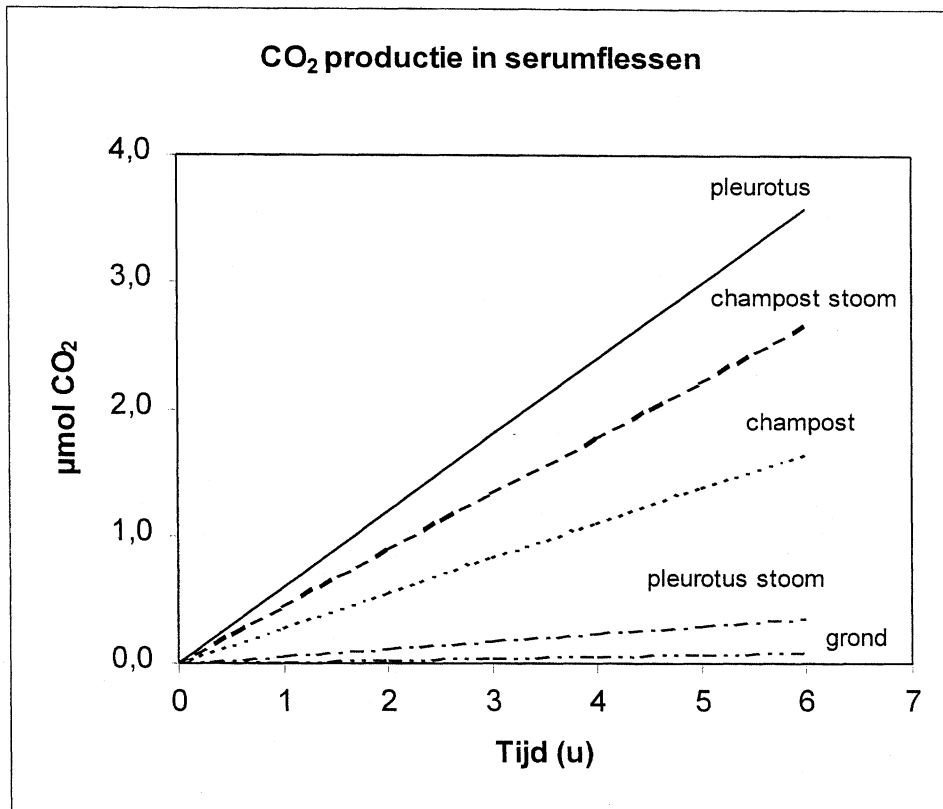
Tabel 14 *Vocht, droge-stofsamenstelling en pH*

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

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

10.2 Bepaling van de metabole activiteit

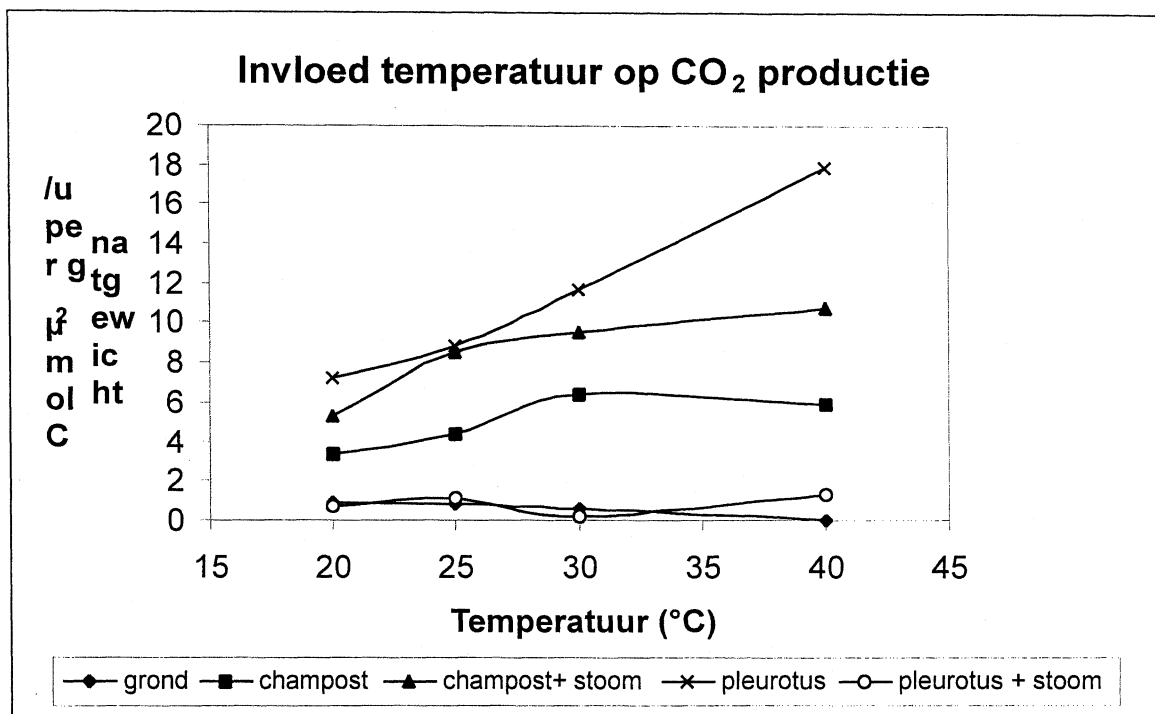
Van de vervuilde grond en van de entmaterialen is de metabole activiteit vastgesteld aan de hand van de CO₂-productie bij kamertemperatuur. De resultaten zijn weergegeven in figuur 13.



Figuur 13 CO₂-productie door grond en entmaterialen in serumflessen

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

Bij een volgend experiment werd de invloed van de temperatuur op de respiratiesnelheid gemeten. De resultaten zijn weergegeven in figuur 14. Het beeld van figuur 13 komt terug in figuur 14. Als er slechts sprake zou zijn van metabole activiteit van de schimmels, dan zou er boven de 30 °C geen activiteit meer zichtbaar zijn. Uit de figuur blijkt dat de activiteit nog sterk toeneemt (*Pleurotus*) of gelijkblijft bij een temperatuur van 40 °C (champost + stoom, champost).



Figuur 14 Invloed van de temperatuur op de CO₂-productie

10.3 Invloed van vochtgehalte op de metabole activiteit

Van de niet-gestoomde entmaterialen werd de invloed van toevoeging van extra water op de metabole activiteit bepaald (tabel 15). Water dat wordt toegevoegd aan het champostmateriaal, wordt niet opgenomen en er ontstaat een modderig mengsel. Bij het *Pleurotus*-residu is een lichte toename te zien als het vochtgehalte wordt verhoogd van 75 naar 80%.

Tabel 15 Invloed van vochtgehalte op de metabole activiteit

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

10.4 Meting van enzymactiviteiten

Aan 10 g van de monsters 7 t/m 9 (zie tabel 14) werd 15 ml water toegevoegd. Na centrifugatie worden enzymmetingen uitgevoerd. Ligninase- en Mn-peroxidase-activiteit werden niet gevonden. De monsters vertoonden wel allemaal laccase-activiteit. Om de invloed van incubatie van grond-entmateriaal mengsels op de laccase-activiteit vast te stellen, werden de monsters 2 t/m 4 gedurende zeven dagen geïncubeerd bij verschillende temperaturen (tabel 16). Uit de metingen blijkt dat bij 20°C de activiteit in het champost-grondmengsel na vijf dagen met een factor 10 is afgenomen. Aan het einde van de incubatie is er echter nog steeds laccase-activiteit aanwezig. Verhoging van de incubatietemperatuur leidt tot een snellere afname van de activiteit. De laccase-activiteit in de *Pleurotus*-grondmengsels is veel stabiel. Bij 20°C is nauwelijks sprake van afname terwijl er bij 30°C zelfs een toename wordt waargenomen. Incubatie bij 40°C zorgt aanvankelijk voor een afname, maar na vijf dagen is er weer sprake van een toename.

Tabel 16 *Invloed van incubatie op de laccase-activiteit**

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

* De activiteit is uitgedrukt in $\Delta E552nm/min/kg$.

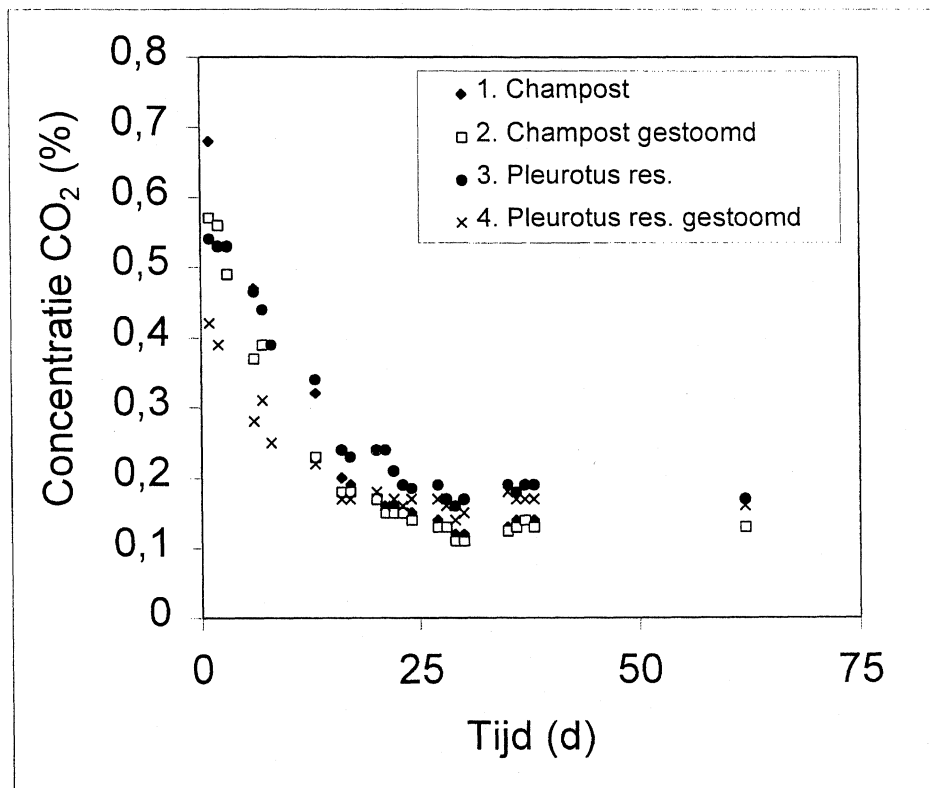
10.5 Incubatie van de mengsels gedurende twee maanden

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

Kolom 1	Champost + grond
Kolom 2	Champost gestoomd + grond
Kolom 3	<i>Pleurotus</i> -residu + grond
Kolom 4	<i>Pleurotus</i> -residu gestoomd + grond

10.6 CO₂-productie van de kolommen

De CO₂-productie werd continu gemeten met een CO₂-analyser. Het verloop van de CO₂-concentratie in de tijd is weergegeven in figuur 15. De CO₂-concentratie in de uitredende lucht bij het begin van het experiment varieert voor de vier kolommen tussen de 0,4 en 0,7%. Hierbij zijn gestoomde residuen lager dan de niet-gestoomde. Na één week is de CO₂-concentratie ongeveer gehalveerd. Vanaf veertien dagen tot aan het einde van het experiment blijft de concentratie duidelijk boven de achtergrondwaarde van 0,05%.



Figuur 15 Het verloop van de CO₂-concentratie in de tijd

10.7 Laccase-activiteit in de kolommen

Op vier dagen werd van de vier kolommen een monster genomen en hiervan werd de laccase-activiteit gemeten (tabel 17). Deze gegevens zijn in overeenkomst met die van de CO₂-producties. De aanvankelijk hoge activiteit daalt aanzienlijk en blijft vervolgens stabiel.

Tabel 17 *Laccase-activiteit van de kolommen**

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

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

10.8 Organische-stofanalyse van de inhoud van de kolommen

Na afloop van het experiment werden monsters genomen om de veranderingen in de hoeveelheid organische stof vast te stellen. De monsters werden eerst gedroogd en vervolgens verast. In tabel 18 is het oorspronkelijk as- en organische-stofgehalte vergeleken met dat na twee maanden incuberen. Als nu aangenomen wordt dat de as-hoeveelheid constant is gebleven, kan worden berekend hoeveel organische stof is afgebroken. De resultaten van deze berekeningen zijn weergegeven in de laatste kolom. Hieruit wordt duidelijk dat er een grote hoeveelheid organisch stof is afgebroken (31-37%).

Tabel 18 *As- en organische-stofgehalte van de inhoud van de kolommen**

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

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

10.9 Gehalte aan organische microverontreinigingen

Voordat de monsters zijn gemeten, is eerst voor iedere component een vijfpuntsijlijn opgesteld [zie RIKILT-rapport 98.01]. Het gehalte aan iedere component in de monsters is met de isotoop-verdunningsmethode berekend ten opzichte van deze ijlijn. In tabel 19 zijn de resultaten van de meting voor verontreinigde grond gemengd met champost gegeven. In de eerste kolom staan de namen van de gemeten componenten. Vervolgens zijn in de volgende vijf kolommen de analyseresultaten van de deelmonsters 2A t/m 2E op tijdstip 0 (dus direct na bereiding door het proefstation) gegeven. Ook zijn het gemiddelde en de bijbehorende standaardafwijking vermeld. Vervolgens zijn de resultaten van deelmonsters afkomstig van tijdstip 2 (dus twee maanden na het door de KUN uitgevoerde experiment) vermeld. Deze monsters zijn eveneens 2A t/m 2E gecodeerd.

Tabel 19 Verontreinigde grond gemengd met champost (gehalten HCH's, DDT's en PCB's in mg/kg; gehalten dioxinen en planaire CB's in ng/kg)

Component	Tijdstip t=0					Tijdstip t=2					Gem		
	2A	2B	2C	2D	2E	Gem	Std	2A	2B	2C		2D	2E
alpha-HCH	0,96	0,83	0,75	0,21	0,62	0,67	0,29	2,06	5,00	0,99	*	2,60	2,66
beta-HCH	9,39	9,13	6,69	4,91	6,31	7,28	1,92	16,04	21,44	10,05	*	19,83	16,84
gamma-HCH	0,014	0,022	0,012	0,006	0,009	0,013	0,006	0,000	0,000	0,012	*	0,000	0,003
delta-HCH	0,033	0,040	0,031	0,026	0,033	0,033	0,005	0,055	0,000	0,047	*	0,069	0,043
epsilon-HCH	0,025	0,030	0,022	0,018	0,024	0,024	0,005	0,047	0,000	0,023	*	0,061	0,033
o,p-DDE	0,003	0,002	0,003	0,002	0,004	0,003	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002
p,p-DDE	0,081	0,102	0,077	0,096	0,105	0,092	0,012	0,088	0,080	0,086	0,098	0,080	0,086
o,p-TDE	0,015	0,020	0,013	0,017	0,020	0,017	0,003	0,015	0,014	0,014	0,018	0,014	0,015
p,p-DDT	0,23	0,33	0,23	0,25	0,34	0,27	0,05	0,26	0,24	0,22	0,29	0,22	0,24
PCB-28	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,041	0,064	0,015	0,008	0,021	0,112	0,011	0,034
PCB-52	0,003	0,019	0,003	0,003	0,031	0,012	0,013	0,010	0,003	0,006	0,029	0,004	0,010
PCB-101	0,015	0,062	0,014	0,011	0,192	0,059	0,077	0,036	0,011	0,032	0,154	0,019	0,050
PCB-118	0,007	0,042	0,006	0,006	0,066	0,025	0,028	0,027	0,006	0,014	0,060	0,009	0,023
PCB-138	0,018	0,063	0,016	0,014	0,274	0,077	0,112	0,045	0,017	0,045	0,237	0,025	0,074
PCB-153	0,014	0,044	0,013	0,010	0,209	0,058	0,085	0,029	0,012	0,033	0,183	0,018	0,055
PCB-180	0,009	0,025	0,009	0,007	0,154	0,041	0,064	0,015	0,008	0,021	0,112	0,011	0,034
2,3,7,8-TCDF	4,39	7,13	5,62	4,96	7,12	5,84	1,25	6,80	**	5,84	7,57	7,01	6,80
2,3,7,8-TCDD	<0,001	0,16	0,09	0,37	0,13	0,19	0,125	0,33	**	0,10	*	0,34	0,26
1,2,3,7,8-PeCDF	2,36	4,04	*	2,62	5,13	3,54	1,29	17,40	**	27,23	6,00	32,11	20,69
2,3,4,7,8-PeCDF	4,73	6,89	2,43	4,79	9,73	5,71	2,74	*	**	*	6,29	4,37	5,33
1,2,3,7,8-PeCDD	0,25	0,48	1,17	0,67	0,39	0,59	0,36	0,40	**	0,96	0,26	1,12	0,69
1,2,3,4,7,8-HxCDF	19,23	17,59	17,26	22,34	293,35	73,95	122,67	14,25	**	21,21	216,92	27,27	69,91
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5,18	5,77	4,75	5,99	43,25	12,95	16,95	*	**	6,02	26,61	6,50	13,04
2,3,4,6,7,8-HxCDF	5,80	7,98	6,13	6,90	40,39	13,44	15,09	7,67	**	8,14	33,35	0,00	12,29
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,058	0,085	<0,001	**	<0,001	<0,001	<0,001	0,055
1,2,3,4,7,8-HxCDD	*	2,66	2,18	*	2,73	2,52	0,30	<0,001	**	<0,001	<0,001	<0,001	11,3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	*	12,5	10,2	10,9	11,0	11,2	1,0	12,6	**	10,0	*	*	3,26
1,2,3,7,8,9-HxCDD	*	5,24	3,90	*	4,55	4,57	0,67	*	**	3,13	*	3,40	129,5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	52,1	62,5	60,3	62,7	347,3	117,0	128,8	66,4	**	60,2	346,1	45,2	8,4
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	*	12,0	10,4	10,0	141,2	43,4	65,2	0,0	**	*	*	16,8	683
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	508	811	493	538	755	621	150	833	**	676	765	458	238
OCDF	348	333	263	226	*	292	58	257	**	*	*	220	7707
OCDD	12324	10943	7375	7060	*	9276	2513	8948	**	*	*	6465	243
3,4,3,4-PCB	108	859	126	121	225	288	323	211	**	176	428	155	19,3
3,4,3,4,5-PCB	7,8	58,1	9,0	9,1	30,6	22,9	21,8	11,9	**	12,7	41,6	11,0	26,9
3,4,5,3,4,5-PCB	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	2,45	2,33	<0,001	**	<0,001	<0,001	<0,001	2,05
Totaal TEQ dioxinen	24,3	27,6	20,2	21,7	57,4	30,2	15,4	24,1	**	14,7	47,1	21,6	26,9
Totaal TEQ planaire CB's	0,84	6,24	0,99	1,00	3,17	2,45	2,33	1,29	**	1,36	4,37	1,17	2,05

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

** = Monster mislukt

Tabel 20 Verontreinigde grond gemengd met Pleurotis (gehalten HCH's, DDT's en PCB's in mg/kg; gehalten dioxinen en planaire CB's in ng/kg)

	Tijdstip t=0					Tijdstip t=2					Gem	Std
	4A	4B	4C	4D	4E	4A	4B	4C	4D	4E		
alpha-HCH	0,50	3,76	0,28	0,21	1,10	1,17	1,49	0,69	*	1,33	1,06	
beta-HCH	11,1	14,9	5,3	5,8	9,8	9,4	4,0	11,8	*	10,2	11,7	
gamma-HCH	0,013	0,061	0,014	0,007	0,016	0,022	0,022	0,021	*	0,028	0,023	
delta-HCH	0,051	0,092	0,151	0,035	0,051	0,076	0,047	0,072	*	0,088	0,070	
epsilon-HCH	0,045	0,000	0,022	0,023	0,035	0,025	0,017	0,047	*	0,045	0,046	
o,p-DDE	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,000	0,002	0,004	0,001	0,002	
p,p-DDE	0,105	0,102	0,102	0,096	0,113	0,104	0,006	0,123	0,102	0,086	0,105	
o,p-TDE	0,019	0,017	0,017	0,017	0,018	0,017	0,001	0,020	0,014	0,014	0,016	
p,p-DDT	0,30	0,26	0,28	0,26	0,29	0,28	0,019	0,36	0,26	0,25	0,30	
PCB-28	<0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,002	0,001	
PCB-52	0,004	0,005	0,004	0,009	0,007	0,006	0,002	0,006	0,005	0,005	0,006	
PCB-101	0,015	0,020	0,015	0,040	0,040	0,026	0,013	0,021	0,018	0,019	0,024	
PCB-118	0,009	0,011	0,008	0,022	0,015	0,013	0,006	0,016	0,010	0,009	0,015	
PCB-138	0,020	0,026	0,020	0,057	0,071	0,039	0,024	0,026	0,022	0,022	0,031	
PCB-153	0,013	0,019	0,015	0,040	0,056	0,029	0,019	0,018	0,015	0,016	0,021	
PCB-180	0,008	0,011	0,009	0,024	0,043	0,019	0,015	0,010	0,009	0,011	0,015	
2,3,7,8-TCDF	6,62	6,69	6,93	6,82	7,35	6,88	0,29	6,84	5,74	*	6,29	
2,3,7,8-TCDD	0,130	0,280	0,260	<0,001	0,130	0,200	0,081	0,340	*	0,340	0,459	
1,2,3,7,8-PeCDF	2,44	*	*	*	2,63	2,53	0,13	24,85	11,23	22,42	14,56	
2,3,4,7,8-PeCDD	4,94	3,75	2,38	4,63	8,23	4,79	2,17	*	*	7,96	6,48	
1,2,3,7,8-PeCDD	0,77	1,54	1,45	0,61	1,04	1,08	0,41	0,41	1,30	0,78	0,81	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	13,7	17,1	14,6	52,5	48,9	29,4	19,6	14,4	13,5	13,8	15,8	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	4,55	4,94	4,29	8,94	9,26	6,39	2,48	4,50	*	*	5,23	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	7,70	7,01	7,44	11,77	9,46	8,67	1,96	6,35	5,46	5,80	6,24	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	15,15	14,55	16,24	14,50	13,69	4,55	0,95	3,44	3,91	*	3,42	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	6,35	6,40	0,00	4,75	0,00	14,83	3,26	10,50	12,80	0,00	9,79	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	55,9	71,0	64,3	93,7	77,9	3,50	14,3	4,77	0,00	0,00	3,02	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	10,41	0,00	8,03	28,09	19,05	72,6	10,78	46,1	41,0	44,6	47,2	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	830	859	941	754	647	13,12	112	7,31	0,00	12,99	5,77	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	220	183	396	*	*	806	114	537	645	586	611	
OCDF	7988	7019	14059	*	*	267	258	272	238	179	241	
OCDD	160	139	140	199	163	9689	3816	8030	8976	5976	8222	
3,4_3,4_PCB	11,02	11,65	10,60	15,34	21,14	160	24	187	157	152	223	
3,4_3,4,5-PCB	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	13,95	4,44	11,32	9,54	9,48	13,79	
3,4,5_3,4,5-PCB	25,7	25,5	31,7	21,3	21,2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Totaal TEQ dioxinen	1,18	1,23	1,16	1,66	2,25	25,1	4,3	21,0	21,4	20,4	22,0	
Totaal TEQ planaire CB's	25,7	25,5	31,7	21,3	21,2	1,50	0,47	1,25	1,05	1,05	1,50	

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

Tabel 21 *Controlemonsters (gehalten HCH's, DDT's en PCB's in mg/kg; gehalten dioxinen en planaire CB's in ng/kg)*

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

1: GRONDMENGSEL

3: GRONDMENGSEL + GESTOOMDE CHAMPOST

5: GRONDMENGSEL + GESTOOMD PLEUROTUSSUBSTRAAT

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

In tabel 20 is het resultaat gegeven van het mengmonster grond geënt met *Pleurotus*-residu. In tabel 21 zijn de gehalten vermeld van het grondmonster zonder entmateriaal en van het grondmonster geënt met respectievelijk doodgestoomde champost en doodgestoomd *Pleurotus*-residu. Deze waarden kunnen, hoewel de meting in enkelvoud uitgevoerd is, worden gebruikt ter controle van het experiment.

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

De resultaten die zijn vermeld in tabel 19 en in tabel 20, zijn statistisch geëvalueerd. Uit deze evaluatie kan worden geconcludeerd dat er geen afbraak in de tijd heeft plaatsgevonden. Toevoeging van champost of *Pleurotus*-residu aan grond die is verontreinigd met HCH, DDT, PCB of dioxinen, geeft geen bijdrage aan de afbraak van deze verbindingen.

HOOFDSTUK 11

CONCLUSIES

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

HOOFDSTUK 12

AANBEVELINGEN

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

LITERATUUR

- Cornelissen, G., P.C.M. van Noort en A.J. Govers, 1997.
Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with TENAX and effects on contact time and solute hydrophobicity, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16-7, p. 1351-1357.
- DLO, 1998.
Intensieve landfarming van verontreinigde baggerspecie: ontwatering en afbraak, RIZA, POSW Fase II, rapport 32.
- Doddema, H.J., M.P. Cuypers, G.B. Derksen, J.T.C. Grotenhuis, M.P. Harkes, J. Harmsen, W.H. Rulkens en A.J. Zweers, 1998.
Karakterisering van baggerspecie voor biologische reiniging, TNO-rapport, TNO-MEP-R 97/399.
- Dijkerman, R., H.J.M. op den Camp, C. van der Drift en L.J.L.D. van Griensven, 1997.
Toepassingsmogelijkheden van (wit-rot) schimmels bij bodemreiniging. Literatuurstudie, Katholieke Universiteit Nijmegen.
- Ferdinandy, M, 1998.
POSW Basisrapport Biologisch Reinigen, drukversie juni 1998 (in voorbereiding).
- Harmsen, J., A. van den Toorn, O.M. van Dijk-Hooyer en H.J.J. Wieggers, 1998.
Haalbare productkwaliteit en risico's bij extensieve landfarming van baggerspecie, SC-DLO-rapportage (in voorbereiding).
- Horen, L.G.J. van, 1994.
Landbouwtelling 1993; cijfers over de champignonteelt, *De Champignoncultuur*, 38:35.
- Riedstra, A., J.A.N.M. Heersche en A. Morssinkhof, 1997.
Biodegradatie van organische microverontreinigingen met behulp van schimmeltechnologie. Resultaten terrarium-proeven fase 1a, BION-rapportage.
- Riedstra, A., J.A.N.M. Heersche en A. Morssinkhof, 1998.
Biodegradatie van organische microverontreinigingen met behulp van schimmeltechnologie. Resultaten terrariumproeven met verse baggerspecie en grond van een voormalig gasfabriekterrein, BION-rapportage.
- Smith, J.F., N. Claydon, M.E. Love, M. Allen en D.A. Wood, 1989.
Effect on substrate depth on extracellular endocellulase and laccase production of *Agaricus bisporus*, *Mycol Res.*, 93, p. 292-296.
- Toorn, A. van den, J.P.G. Gerrits, O.M. van Dijk-Hooyer, J. Harmsen en H.J.J. Wieggers, 1997a.
Toepassingsmogelijkheden van schimmeltechnologie bij verontreinigde baggerspecie, SC-DLO-rapport nr. 523.
- Toorn, A. van den, O.M. van Dijk-Hooyer, J. Harmsen en H.J.J. Wieggers, 1997b.
Toepassingsmogelijkheden van schimmeltechnologie bij verontreinigde baggerspecie onder praktijkomstandigheden, SC-DLO interne rapportage.

BIJLAGE A

**TOEPASSINGSMOGELIJKHEDEN VAN (WIT-ROT) SCHIMMELS BIJ BODEMREINIGING. EEN
LITERATUURSTUDIE**

**dr. R. Dijkerman, dr. H.J.M. op den Camp, dr. C. van der Drift
en prof. dr. L.J.L.D. van Griensven**

Voorwoord

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

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

DHV is penvoerder van het consortium dat wordt gesponsord door:

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

Het voorliggende deelonderzoek is uitgevoerd door de Katholieke Universiteit Nijmegen en het Proefstation voor de Champignoncultuur. Het onderzoek maakt deel uit van spoor II - fase 1: oriëntatie en selectie van schimmels voor biodegradatie van gechloreerde verbindingen. In onderstaand schema is de plaats van het deelonderzoek in het totale project gegeven:

Biodegradatie van microverontreinigingen met schimmeltechnologie	
Spoor I Olie en PAK	
Spoor II PCB's, HCH, DDT en dioxines	
Fase 1. Pilotonderzoek en toetsing	
Fase 1. Oriëntatie en selectie schimmels	
1a	Pilotonderzoek: - Tunnelproeven - Halproeven - Landfarmproeven
1a	<i>Literatuuronderzoek</i>
1b	Toetsing aan andere biologische technieken
1b	Laboratoriumonderzoek: - Biologisch - Chemisch analytisch
Fase 2. Praktijkproeven: - Tunnelproeven - Halproeven - Landfarmproeven	
Fase 2. Pilotonderzoek: - Tunnelproeven - Halproeven - Landfarmproeven	
Fase 3. Praktijkproeven	
Fase 3. Evaluatie	
3a	Opschalings- en uitvoeringsaspecten
3b	Eindrapportage

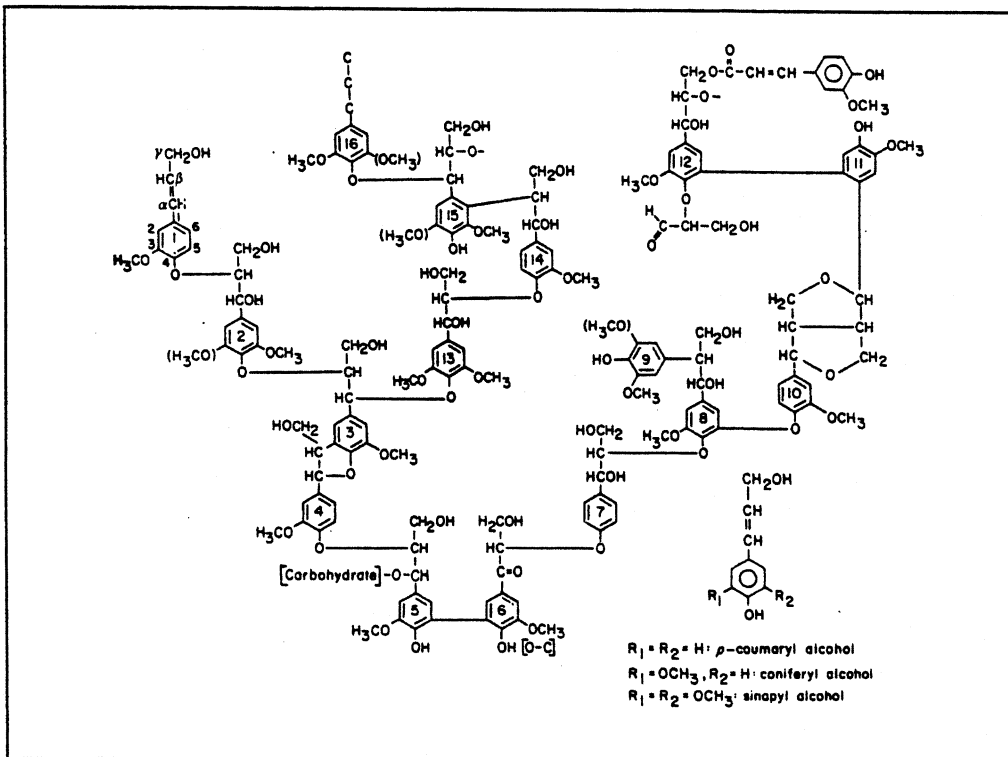
Het literatuuronderzoek geeft de achtergrondkennis weer over de mechanismen waarmee (wit-rot)schimmels (gehalogeneerde poli-)cyclische koolwaterstoffen afbreken. Na een algemeen overzicht van het ligninolytische enzymstelsel wordt de aandacht met name gericht op de biodegradatie van HCH's, PCB's, dioxinen en DDT met behulp van schimmels. De literatuur is verzameld tot en met februari 1997.

Inhoudsopgave

1. Inleiding	3
2. Ligninolytische enzymsystemen van wit-rot schimmels	5
2.1. Inleiding	5
2.2. Lignine peroxidase (ligninase)	5
2.3. Mn-peroxidase	6
2.4. Laccase	7
2.5. H ₂ O ₂ -genererende enzymen	7
3. Biodegradatie van xenobiotica door wit-rot schimmels	8
3.1. Inleiding	8
3.2. Biodegradatie van xenobiotica door <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	9
3.2.1. Inleiding	9
3.2.2. DDT (1,1,1-trichloor-2,2-bis-4-chloorfenylethaan)	10
3.2.3. Pentachloorfenol (PCP)	15
3.2.4. PCB's (polychloorbifenylen)	19
3.2.5. HCH's (hexachloorhexaan)	22
3.2.6. Dioxines	22
4. Biodegradatie van xenobiotica door <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Agaricus bisporus</i> en <i>Coprinus comatus</i>	24
4.1. PCB-degradatie door <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
4.2. DDT-afbraak door <i>Pleurotus ostreatus</i>	26
5. Conclusie/suggesties	27
6. Literatuur	29

1. Inleiding

Bodemverontreinigingen bestaan vaak uit verbindingen als polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's), polychloorbifenylen (PCB's), hexachloorcyclohexaan (HCH), DDT (1,1-bis(4-chlorofenyl)-2,2,2-trichloorethaan), pentachloorfenol (PCP) en dioxines. Deze verbindingen komen van nature niet voor en worden daarom aangeduid met de term xenobiotica. De verbindingen komen vaak door menselijk handelen in de natuur terecht. Bacteriële afbraak van deze verbindingen is zeer moeilijk of zelfs onmogelijk. Zo zijn PAK's met vier of meer ringen, evenals PCB's met vier of meer chloor-atomen per bifenyl, resistent tegen bacteriële degradatie [41, 92].



Figuur 1. Schematische structuur voor lignine [59]. De structuur toont belangrijke 'interunit'-verbindingen en andere chemische bindingen. De drie alcoholen waaruit, als gevolg van polymerisatiereacties, lignine is opgebouwd zijn rechtsonder in de figuur aangegeven.

Wit-rot schimmels zijn, vanwege hun productie van extracellulaire ligninolytische enzymen, in staat lignine af te breken. Lignine is een complexe polymeer (Figuur 1) die gekenmerkt wordt door een veelvoud van chemische bindingen [59]. Dit wordt veroorzaakt doordat bij de synthese allerlei radicaal-gedreven polymerisaties plaatsvinden. Bij de afbraak wordt lignine via radicaal-mechanismen aangevallen (zie hieronder). Dit maakt de afbraak van lignine non-specifiek [4, 52]. Het gevolg is dat ook veel verontreinigende verbindingen, vanwege de structurele overeenkomst met onderdelen van lignine, in principe afgebroken kunnen worden door het ligninolytisch systeem van deze schimmels [52, 14]. Dit maakt deze organismen interessant voor toepassing op het gebied van bodemreiniging. Voordat wordt ingegaan op het specifieke gebruik van wit-rot schimmels voor afbraak van de hierboven genoemde xenobiotica, is het van belang enige algemene eigenschappen van de ligninolytische systemen van wit-rot schimmels te bespreken.

Table 1. The production of extracellular oxidative enzymes by basidiomycetes

Fungus	Type ¹	Ligninolytic enzymes ²					
		LiP	MnP	Per	Lac	Glyox	AAO
<i>Agaricus bisporus</i>		(+)	+		+		
<i>Armillaria mellea</i>	WR	-	+		+		
<i>Armillaria ostoya</i>	WR	-	+		+		
<i>Bjerkandera adusta</i>	WR	+	+	+	+	+	+
<i>Bjerkandera sp. BOS55</i>	WR	+	+	+	+	+	+
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	WR	-	+		+	-	
<i>Coprinus cinereus</i>				+	-		
<i>Corioloopsis occidentalis</i>	WR	+	+				
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	WR	-	+		+	-	-
<i>Dichomitus squalens</i>	WR	-	+	+	+	+	-
<i>Ganoderma australis</i>	WR		+				
<i>Ganoderma valesiacum</i>		-	+		+		
<i>Gleophyllum trabeum</i>	BR	-	-	+	-		
<i>Inonotus (Phellinus) weirii</i>	WR	-	-	+			
<i>Junghuhnia separabilima</i>	WR	+		+	+		
<i>Lentinula edodes</i>	WR	+/-	+		+		
<i>Merulius (Phlebia) tremellosus</i>	WR	+/-	+		+		
<i>Panus tigrinus</i>	WR	-	+		+		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	WR	+	+	-	-	+	-
<i>Phanerochaete flavido alba</i>	WR	+	+				
<i>Phanerochaete magnolia</i>	WR	+	+				
<i>Phlebia brevispora</i>	WR	+	+	-	+	+	
<i>Phlebia ochraceofulva</i>	WR	+	-		+		
<i>Phlebia radiata</i>	WR	+	+		+	+	
<i>Phlebia subserialis</i>	WR	-	+				
<i>Phellinus igniarius</i>	WR	-	-		+		
<i>Phellinus pini</i>	WR	+	+				
<i>Piptoporus betulinus</i>	BR	-	+		-		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WR	-	+		+		+
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	WR	-	+		+		+
<i>Polyporus ostreiformis</i>	BR	+					
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	WR	-	-	+	+		
<i>Stereum hirsutum</i>	WR	-	+	-	+		
<i>Trametes gibbosa</i>	WR	+	+	-	+		
<i>Trametes hirsuta</i>	WR	+	+	-	+		
<i>Trametes versicolor</i>	WR	+	+		+	+	+
<i>Trametes villosa</i>	WR	-	+		+	+	-

Table adapted from [52]. *A. bisporus* information from [12].

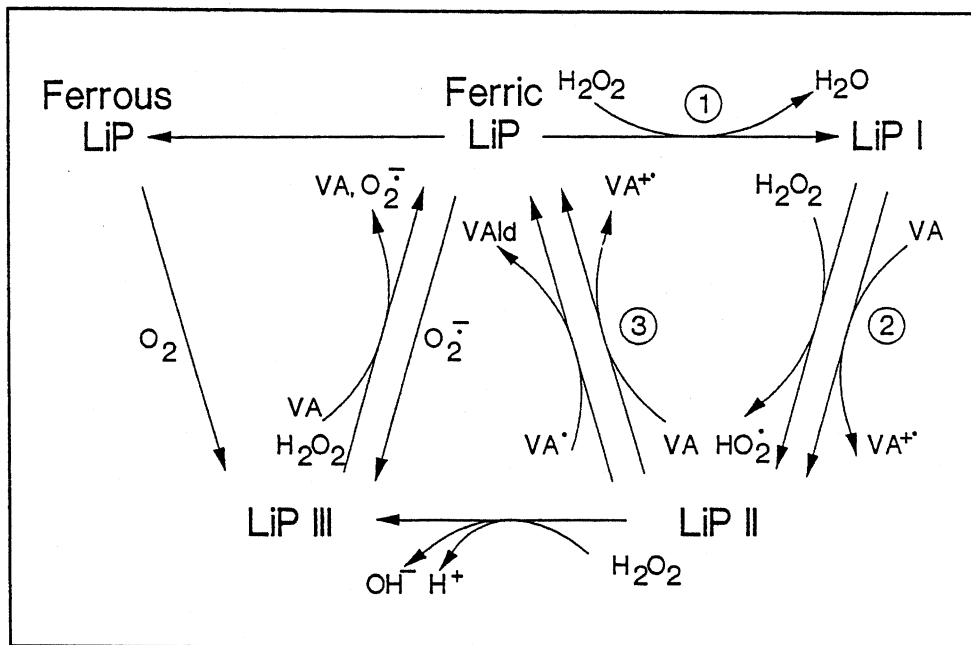
¹ Fungi which give a white-rot (WR) or brown-rot (BR) type of wood decay.

² Extracellular ligninolytic enzymes detected, including lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), peroxidase (Per), laccase (Lac), glyoxal oxidase (Glyox) and aryl alcohol oxidase (AAO).

2. Ligninolytische enzymesystemen van wit-rot schimmels

2.1. Inleiding

De meeste studies met betrekking tot het ligninolytisch systeem van wit-rot schimmels zijn uitgevoerd met *Phanerochaete chrysosporium* als modelorganisme. Daarnaast is dergelijk onderzoek in beperktere mate beschreven voor diverse andere wit-rotters (zie Tabel 1 [52]), waaronder *Pleurotus ostreatus* (oesterzwam). De afbraak van lignine door *P. chrysosporium* treedt op gedurende het secundaire metabolisme (iodofase) van de schimmel, als gevolg van koolstof-, stikstof- of zwavel-limitatie [59, 22, 70]. Hoewel lignine rijk is aan koolstof, is het geen groei-substraat voor wit-rot schimmels. Lignine wordt alleen gemetaboliseerd als er tevens een andere koolstof/energiebron aanwezig is [59, 22, 24]. In het natuurlijke lignine bevattende substraat (plantaardige vezels) komen cellulose en hemicellulose hiervoor in aanmerking, maar ook eenvoudige monomere koolhydraten als glucose kunnen als primair groeisubstraat worden gebruikt. De belangrijkste componenten van ligninolytische enzymesystemen van wit-rot schimmels zijn lignine peroxidases (LiP), mangaan-afhankelijke peroxidases (MnP), laccases en H_2O_2 -genererende systemen (aryl alcohol oxidases en glyoxaal oxidase). Een overzicht van het voorkomen van deze enzym bij basidiomyceten is gegeven in Tabel 1.



Figuur 2. Interrelatie tussen de geoxideerde intermediairen van lignine peroxidase (LiP) [52]. De katalytische cyclus is aangegeven met de reacties 1, 2 en 3. VA = veratryl alcohol; VA⁺ = veratryl alcohol kation radicaal; VA· = veratryl alcohol radicaal.

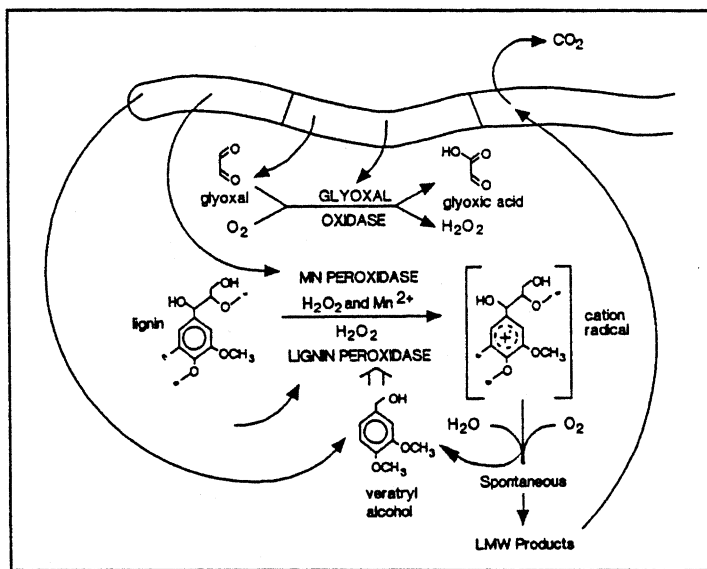
2.2. Lignine peroxidase (ligninase)

Het LiP is ontdekt in ligninolytische cultures van *P. chrysosporium* [45, 87] en wordt door vele andere wit-rot schimmels geproduceerd. Opmerkelijk is dat ook een aantal wit-rot schimmels geen LiP-activiteit vertonen, terwijl ze toch uitstekend lignine af kunnen breken. LiP kan vanwege zijn hoge redoxpotentiaal zowel fenolische als niet-fenolische lignine-componenten

oxideren [52]. Het enzym wordt beschouwd als de sleutelcomponent van het ligninolytisch systeem, met name vanwege het feit dat het zo'n hoge redoxpotentiaal heeft, nodig voor de oxidatie van niet-fenolische aromatische eenheden die tot 85% van het lignine polymeer uitmaken [52, 45, 87]. De katalytische cyclus van LiP is weergegeven in Figuur 2 [52]. Het LiP, dat een haem-prosthetische groep bevat (Fe^{III}), wordt in een 2-electron oxidatie geoxideerd door H_2O_2 tot LiP I, een Fe^{IV} porphyrine kation radicaal intermediair. LiP I wordt vervolgens weer gereduceerd tot het oorspronkelijke enzym door twee 1-electron reacties, waarbij verbinding II (LiP II) als intermediair optreedt. In dat proces wordt het aromatische substraat, bijv. veratryl alcohol (VA) geoxideerd tot een aryl-kation radicaal. In afwezigheid van reducerend substraat wordt LiP II verder geoxideerd tot LiP III. Dit inactieve enzym kan spontaan of in aanwezigheid van zowel H_2O_2 en een reducerend substraat, zoals VA, terugkeren naar de natieve vorm [25, 46]. Meer recentelijk is aangetoond dat het kation radicaal van VA, en dus niet VA zelf, verantwoordelijk is voor deze reactivering van LiP III naar LiP [9].

VA, een secundair metaboliet van wit-rot schimmels, is absoluut vereist voor de LiP-gedreven afbraak van lignine. De haem-groep van LiP is in het eiwit ingebouwd, en is daarmee niet beschikbaar voor directe interactie met lignine. Het VA treedt op als een radicaal mediator tussen het enzym en het polymere substraat [52]. Hierbij wordt VA geoxideerd via een kation radicaal intermediair, dat vervolgens lignine kan oxideren, waarbij weer VA ontstaat dat opnieuw gebruikt kan worden voor een volgende LiP-gekatalyseerde ladingsoverdracht-reactie (Figuur 3) [52]. Vanwege de vorming van radicale groepen in het door LiP geoxideerde lignine vindt afbraak van het polymeer plaats via o.a. $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ splitsing en ringopening [38, 50].

In het algemeen wordt de synthese van ligninolytische enzymen teweeg gebracht door N-limitatie. Echter, bij sommige wit-rotters wordt de lignine afbraak niet onderdrukt door hogere N-concentraties. Zo produceren een aantal *Bjerkandera* spp. alleen LiP in een organisch stikstofrijk medium [54, 58]. Ook het Mn-gehalte is van invloed op de LiP-productie, waarbij in het algemeen een negatieve correlatie wordt gezien [74]. Productie van LiP door *Pleurotus* spp., *Agaricus bisporus* (champignon) en *Coprinus* spp. is tot nu toe niet aangetoond (Tabel 1).



Figuur 3. Het ligninolytisch systeem van de wit-rot schimmel *Phanerochaete chrysosporium* [52].

2.3. Mn-peroxidase

Het mangaan-afhankelijke peroxidase (MnP) katalyseert de oxidatie van Mn^{2+} door H_2O_2 , waarbij het gevormde Mn^{3+} vervolgens verscheidene fenolische lignine verbindingen oxideert via fenoxylradicalen [52]. Non-fenolische componenten worden, vanwege de lagere redoxpotentiaal van MnP ten opzichte van LiP, niet afgebroken m.b.v. MnP [52]. De katalytische cyclus van MnP is vergelijkbaar met die van LiP [7, 94-96]. De oxidatie van fenolische substraten vindt slechts plaats wanneer Mn^{3+} een complex heeft gevormd met een chelator, zoals

oxalaat en malonaat [96]. Deze chelatoren worden door de basidiomyceten zelf geproduceerd [52] en zorgen voor de dissociatie van Mn^{3+} van het enzym [96]. Het Mn^{2+} -chelatorcomplex diffundeert van het enzym naar het polymere substraat en fungeert daarmee als een mediator, vergelijkbaar met de rol van VA in de LiP-reactie. De synthese van MnP door wit-rotters wordt gestimuleerd door de aanwezigheid van Mn^{2+} [11, 15, 74]. Productie van MnP door *Coprinus* spp. is tot nu toe niet aangetoond (Tabel 1). *Pleurotus* spp. produceren daarentegen wel MnP. De productie van MnP door deze basidiomyceet wordt, in tegenstelling tot *P. chrysosporium*, gestimuleerd onder N-rijke condities [53]. Recentelijk is door Bonnen et al. [12] aangetoond dat ook *Agaricus bisporus*, gegroeid op compostextract, MnP produceert. De productie van het enzym door deze schimmel valt samen met de vorming van laccase (zie hieronder) en de afname van het lignine gehalte in de compost. De lignine afname [34], en daarmee de productie van MnP (en laccase) neemt toe gedurende de periode van het uitgroeien van het mycelium tot en met de vorming van knoppen (begin van vruchtlichamen) om vervolgens vanaf het begin van uitgroeien van het vruchtlichaam af te nemen [12]. Hetzelfde fenomeen treedt op bij de hierop volgende oogstcycli (vluchten).

2.4. Laccase

Laccase is een 'blue copper' oxidase dat de 1-electron oxidatie van fenolen en fenolische lignine structuren (via fenoxylradicalen) katalyseert, waarbij uiteindelijk 4 electronen worden overgedragen op O_2 en water wordt gevormd [81]. De 1-electron oxidatie heeft o.a. C_{α} -oxidatie en aryl-alkyl-splitsing tot gevolg [100]. Daarnaast is ook een ringsplitsend effect van het enzym aangetoond [55]. Het enzym wordt door bijna alle wit-rot schimmels (Tabel 1), waaronder *Pleurotus* spp., geproduceerd. Echter, *P. chrysosporium* heeft het enzym niet nodig voor lignine afbraak. Hoewel de fysiologische rol van laccase nog onduidelijk is [52], is gebleken dat de snelheid van lignine afbraak door *Pleurotus* spp. correleert met de productie van laccase bij groei op lignine bevattende media [2]. Bovendien vindt geen afbraak plaats door laccase-deficiënte mutanten [73] en wordt de laccase activiteit geïnduceerd door toevoeging van lignine monomeren aan het medium [57]. Vanwege de lage redoxpotentiaal van laccase kan het enzym niet een directe oxidatie van non-fenolische lignine groepen bewerkstelligen [50]. Echter, de wit-rotter *Pycnoporus cinnabarinus*, die onder ligninolytische condities wel laccase maar geen LiP en MnP [37] produceert, blijkt in staat lignine (tot 85% non-fenolische groepen) net zo snel en in dezelfde mate af te breken als *P. chrysosporium* [49]. Recentelijk is aangetoond dat *P. cinnabarinus*, om de hoge redoxpotentiaal-barrière te overwinnen, een metabooliet (3-hydroxyanthranilaat) uitscheidt, dat als redoxmediator fungeert [36].

De productie van laccase door *P. ostreatus* wordt gestimuleerd onder N-rijke condities [53], zoals ook het geval was voor de MnP-productie van deze schimmel. Ook vindt een hogere laccase productie plaats in aanwezigheid van tarwestro of tabakssap [43].

Ook *Agaricus bisporus* scheidt laccase uit [89, 97]. Het enzym kan tot ca. 2% van het totaal geproduceerde eiwit uitmaken [98]. De activiteit van het enzym wordt groei-gereguleerd [89, 99] en correleert direct met de verdwijning van lignine uit het compostsubstraat [34, 93] en de mineralisatie van ^{14}C -gelabeld lignine naar $^{14}CO_2$ [34].

2.5. H_2O_2 -genererende enzymen

Lignine biodegradatie vereist H_2O_2 . Wit-rot schimmels beschikken daartoe over enzymen die H_2O_2 vormen. Een van de betrokken enzymen is het extracellulaire arylalcohol oxidase (AAO) dat door verscheidene wit-rotters wordt geproduceerd (Tabel 1). Het enzym oxideert aromatische alcoholen tot aldehydes en reduceert O_2 tot H_2O_2 [52]. Het MnP katalyseert door oxidatie van

NAD(P)H ook vorming van H_2O_2 [3]. Daarnaast genereren ook nog andere extracellulaire enzymen zoals glyoxaal oxidase (Figuur 3) en pyranose 2-oxidase [52] H_2O_2 .

3. Biodegradatie van xenobiotica door wit-rot schimmels

3.1. Inleiding

Het gebruik van wit-rot schimmels voor de afbraak van xenobiotica lijkt om diverse redenen veelbelovend. Veel milieuverontreinigingen zijn persistent in het milieu vanwege hun slechte oplosbaarheid in water of omdat ze zijn geadsorbeerd aan de bodem. Hierdoor is de beschikbaarheid voor bacteriën laag [20]. De beschikbare concentratie van de verontreinigende component kan te laag zijn om de enzymen, die nodig zijn voor afbraak, te induceren [20]. Deze beperking geldt echter niet voor wit-rot schimmels, omdat de productie van het extracellulaire ligninolytisch enzymstelsel van deze organismen wordt geïnitieerd door een tekort aan stikstof en niet door de aanwezigheid van substraat. De aanwezigheid van hoge concentraties van recalcitrante verontreinigingen is dus niet vereist voor de inductie van de benodigde enzymen [20]. Bovendien zijn bij de ligninolytische enzymstelsels vrije radicalen betrokken, hetgeen in theorie tot volledige oxidatie van het substraat leidt [39]. Andere enzymstelsels worden in hun efficiëntie van afbraak beperkt door de K_m : biodegradatie tot een aanvaardbaar niveau vereist een hoge affiniteit van het enzym voor het substraat [39]. Een ander belangrijk voordeel van het lignine-degraderende systeem van wit-rotters is het feit dat het afbraakmechanisme, door de betrokkenheid van vrije radicalen, zeer non-specifiek en non-stereoselectief is [45, 87]. Dit is van groot belang voor (bodem)reiniging, omdat milieuverontreiniging niet zelden door meerdere verbindingen wordt veroorzaakt.

De wit-rot schimmel die veruit het best is bestudeerd met betrekking tot de afbraak van xenobiotica als PCB's, PCP, DDT, lindaan (γ -HCH) en dioxines is *Phanerochaete chrysosporium*. De kennis die met behulp van dit modelorganisme is vergaard dient als basis voor dit rapport.

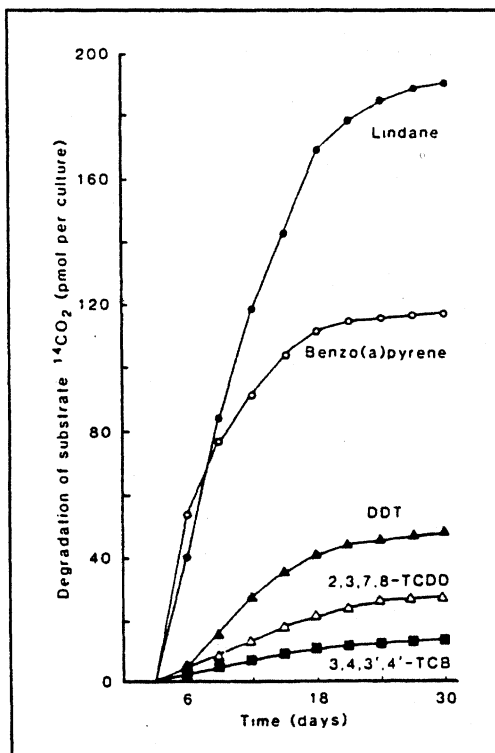
Table 2. Examples of environmental pollutants degraded by *Phanerochaete chrysosporium* (from [8]).

Polycyclic aromatic compounds	Dyes
Benzo(a)pyrene	Crystal violet
Pyrene	Azure blue
Anthracene	
Chrysene	Munitions
	TNT (trinitrotoluene)
Chlorinated aromatic compounds	RDX (cyclotrimethylenetrinitroamine)
Pentachlorophenol	HMX (cyclotetramethylenetetranitroamine)
4-Chloroaniline	
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid	Others
Polychlorinated biphenyls	Cyanides
Dioxin	Azide
	Aminotriazole
Pesticides	Carbon tetrachloride
DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis[4-chlorophenyl]ethane)	
Lindane (γ -hexachlorohexane)	
Chlordane	
Toxaphene	

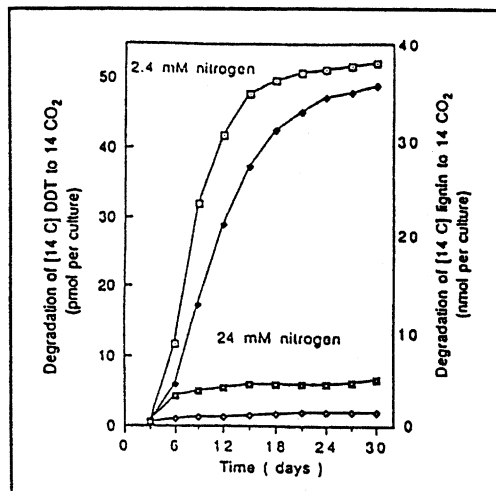
3.2. Biodegradatie van xenobiotica door *Phanerochaete chrysosporium*

3.2.1. Inleiding

De mesofiele wit-rot schimmel *P. chrysosporium* is vanwege zijn krachtige ligninolytische enzymstelsel door vele wetenschappers bestudeerd met betrekking tot de biologische afbraak van xenobiotica. Tabel 2 [13] geeft een overzicht van toxische verbindingen die door deze schimmel kunnen worden afgebroken. Radioactief gelabelde (^{14}C op de ringkoolstof) xenobiotica als DDT, 3,4,3',4'-tetrachloorbifenyl (3,4,3',4'-TCB), 2,3,7,8-tetrachloordibenzo-p-dioxine (2,3,7,8-TCDD), lindaan en benzo(a)pyreen worden geoxideerd tot $^{14}\text{CO}_2$ (Figuur 4) door stikstof-gelimiteerde, ligninolytische cultures van *P. chrysosporium* [20]. Dit toont aan dat volledige afbraak mogelijk is. De positieve correlatie tussen de mineralisatie van de xenobiotica en de aanwezigheid van het lignine degraderende systeem van de schimmel suggereerde dat dit enzymstelsel mogelijk verantwoordelijk is voor dergelijke activiteiten. Daarnaast bestaan er nog diverse andere sterke aanwijzingen dat het ligninolytisch enzymstelsel van *P. chrysosporium* bij de degradatie van xenobiotica betrokken is. Zo vindt er weinig of geen afbraak van lignine en DDT plaats onder stikstofrijke omstandigheden [4, 20, 39], zoals blijkt uit Figuur 5 en Tabel 3. Daarnaast is, analoog aan lignine degradatie, een makkelijk bruikbare koolstofbron nodig voor de mineralisatie van verontreinigingen [4, 40]. Dit wordt duidelijk aan de hand van de resultaten weergegeven in Figuur 6a met betrekking tot de afbraak van phenanthreen door *P. chrysosporium* [16]. De mineralisatie van deze component stopt op het moment dat de initiële toegevoegde glucose is verbruikt. Na toevoeging van extra glucose treedt een volgende mineralisatiefase op [16]. In plaats van glucose kan ook cellulose als koolstofbron worden gebruikt (Figuur 6b) [40]. Dit substraat levert een kleine maar constante toevoer van glucose, hetgeen waarschijnlijk de reden is voor de hogere mineralisatiegraad van DDT [40].



Figuur 4. Snelheid van oxidatie van een aantal geselecteerde persistente organische verontreinigingen naar CO_2 door *P. chrysosporium* [20]. 3,4,3',4'-TCB: 3,4,3',4'-tetrachloor-bifenyl; 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetrachloordi-benzo-p-dioxine; DDT: 1,1,1-trichloor-2,2-bis-4-chloor-fenylethaan; lindaan: 1,2,3,4,5,6-hexachloorcyclohexaan.



Figuur 5. Effect van de N-concentratie op de oxidatie van lignine (\square , \square) en DDT (\diamond , \blacklozenge) naar CO_2 door *Phanerochaete chrysosporium* [20].

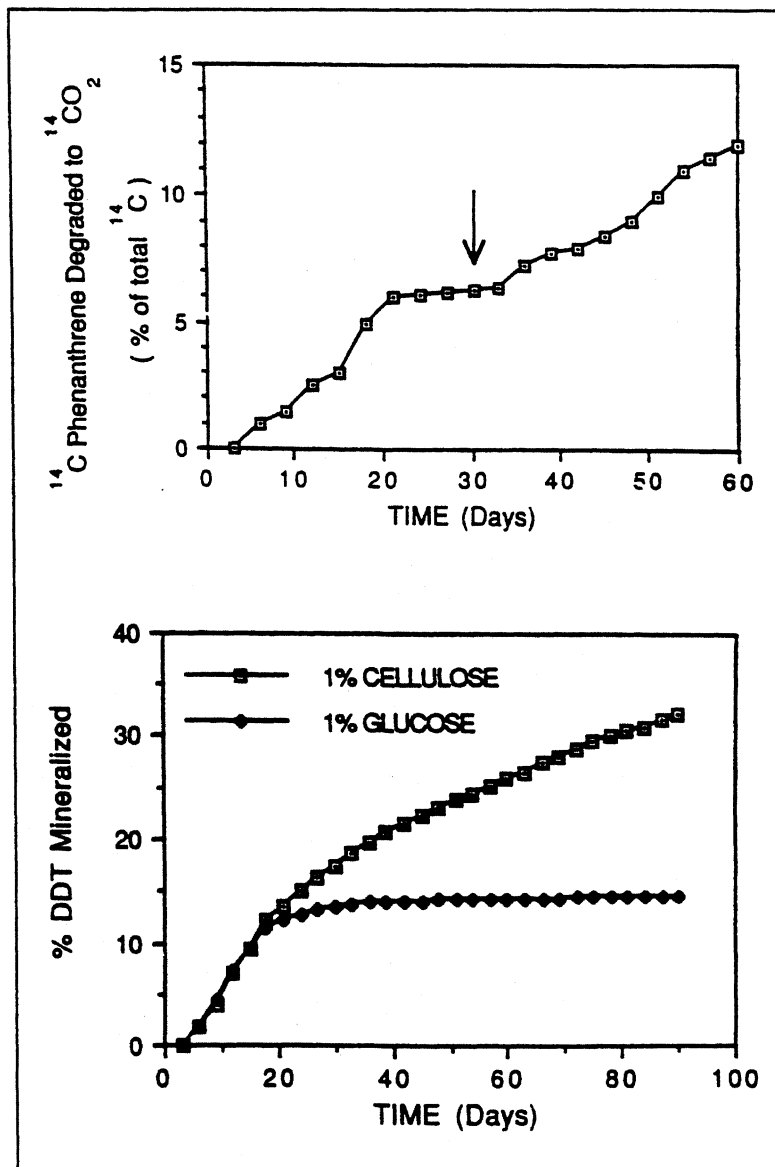
Table 3. Effect of nutrient nitrogen concentration on mineralization of lignin and DDT by *P. chrysosporium* (adapted from [4]).

Compound	Initial concentration	% Mineralized in 30 days	
		Ammonium tartrate concentration	
		1.2 mM	12 mM
Lignin	81 nM	45	6.2
DDT	125 nM	28	1.2

3.2.2. DDT (1,1,1-trichloor-2,2-bis-4-chloorfenylethaan)

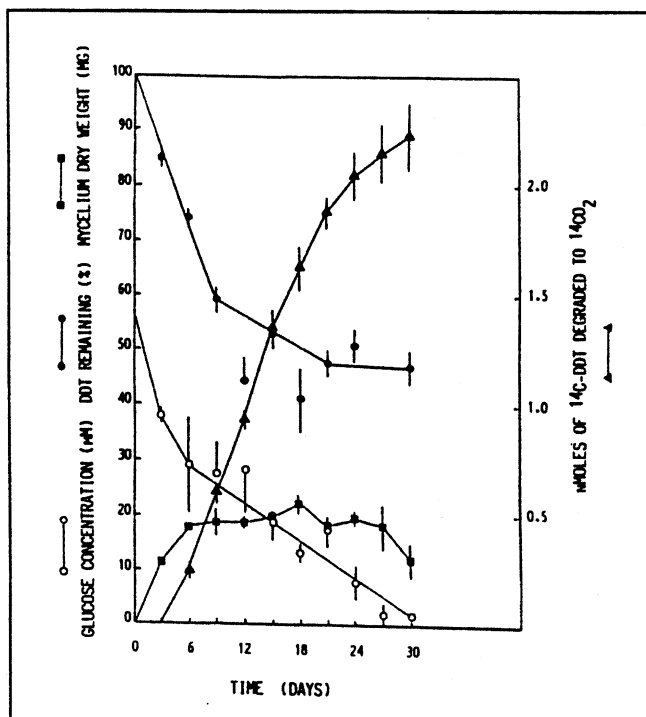
Diverse studies hebben aangetoond dat *P. chrysosporium* in staat is om [^{14}C]DDT te mineraliseren [17, 20, 21, 40]. Ook dit proces verloopt onder ligninolytische condities ofwel stikstoflimitatie. Optimale mineralisatie vindt plaats bij pH 3,5 - 5,5 [40], hetgeen overeenkomt met de optimale condities voor zowel groei van *P. chrysosporium* als de mineralisatie van [^{14}C]lignine door deze wit-rotter [60]. Figuur 7 illustreert de afbraak van DDT door cultures van de schimmel [18]. Naast het verdwijnen van het xenobioticum is de mineralisatie tot CO_2 in de figuur weergegeven. Gedurende de eerste 3 dagen neemt de hoeveelheid DDT met 15% af, terwijl nog geen mineralisatie (CO_2 -vorming) werd waargenomen. Omdat gedurende deze eerste periode nog geen ligninolytische enzymen aanwezig zijn (primair metabolisme), lijkt de betrokkenheid van deze enzymen uitgesloten. Kohler et al. [61] wezen de betrokkenheid van LiP bij de afbraak van DDT van de hand. Deze auteurs baseerden hun stelling op hun bevinding dat er ook DDT-afname plaats vond onder stikstofrijke condities (geen LiP-productie). Inmiddels is echter bekend dat de initiële afname van DDT, zonder DDT-mineralisatie, wordt veroorzaakt door een reductieve dechlorering van DDT naar DDD (1,1-dichloor-2,2-bis(4-chloorfenyl)ethaan (zie Figuur 8 [19] voor de structuur), een proces waarbij mogelijk de membraanpotentiaal van de schimmel een rol speelt [8]. Gedurende de eerste 3 dagen werd door Bumpus en Aust [18] DDD als enige metaboliet gevonden. Daarna werd deze verbinding, met het verschijnen van het ligninolytisch enzymstelsel [88], verder gemetaboliseerd (zie hier-

onder). Door Fernando et al. [40] is ook nog een ander primair metaboliet gevonden, namelijk DDE (zie Figuur 8). Beide verbindingen (DDD en DDE) kunnen door de schimmel worden afgebroken. Dit is met name van belang voor DDE, omdat degradatie van deze component door andere microorganismen tot nu toe niet is aangetoond. In diverse beschreven routes van microbiële DDT-metabolisme is DDE een eind-product [64, 75]. De belangrijkste afbraakroute voor DDT verloopt echter via een hydroxyleringsstap van DDT naar dicofol (2,2,2-trichloor-1,1-bis(4-chloorfenyl)ethanol), dat vervolgens via verbinding FW-152 (2,2-dichloor-1,1-bis(4-chloorfenyl)ethanol) wordt gemetaboliseerd naar DBP (4,4'-dichloorbenzofenon). Al deze metaboliëten worden aangetroffen gedurende de afbraak van DDT. De snelheid waarmee DDT wordt afgebroken neemt af naarmate de concentratie van de koolstofbron (glucose) gedurende het afbraak-proces afneemt (Figuur 7) [18].



Figuur 6. Mineralisatie van phenanthreen en DDT door *P. chrysosporium* [4]. De afbraak van ¹⁴C-phenanthreen (a) werd uitgevoerd met cultures die anthraceenolie (50 mg/liter) bevatten. De pijl geeft het tijdstip aan waarop extra glucose (56 mM) werd toegevoegd. De afbraak van ¹⁴C-DDT (b) werd uitgevoerd in aanwezigheid van 1% glucose of cellulose.

Na 30 dagen, het moment dat er geen koolstofbron meer aanwezig is, is er ongeveer 50% van de hoeveelheid DDT afgebroken [18, 21]. Gedurende deze periode is 5% van het DDT volledig gemineraliseerd. Wanneer opnieuw glucose wordt toegevoegd, treedt nagenoeg volledige DDT-afbraak op (Tabel 4) [21]. Hierbij vindt dan geen accumulatie van DDD (en DDE) plaats [21]. DBP wordt wel aangetroffen (ca. 25% van de initiële DDT-hoeveelheid) [21]. Producten als gevolg van reductieve dechlorering of aromatische ringsplitsing zijn tot nu toe niet aangetroffen in cultures van *P. chrysosporium* geïncubeerd met [¹⁴C]DDT. Dit suggereert dat deze producten eenvoudig worden gemetaboliseerd naar CO₂ en dus niet accumuleren [18].



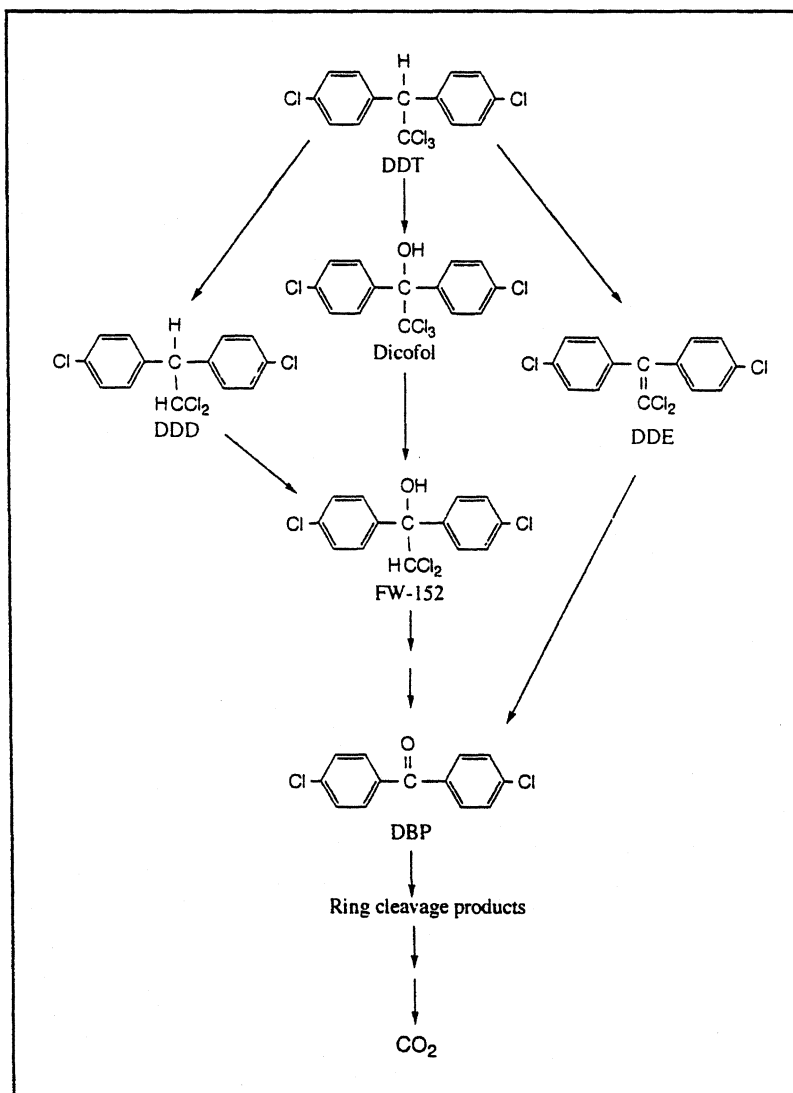
Figuur 7. DDT-verdwijning (●), DDT-mineralisatie (▲), glucoseverbruik (○) en verandering in het drooggewicht (■) in N-arme cultures van *P. chrysosporium* [18]. De beginconcentratie DDT was 4,8 µM.

Table 4. Effect of supplemental glucose on the degradation of DDT by *P. chrysosporium* (adapted from [21]). Glucose was added at the beginning of the experiment and at day 31 and day 61.

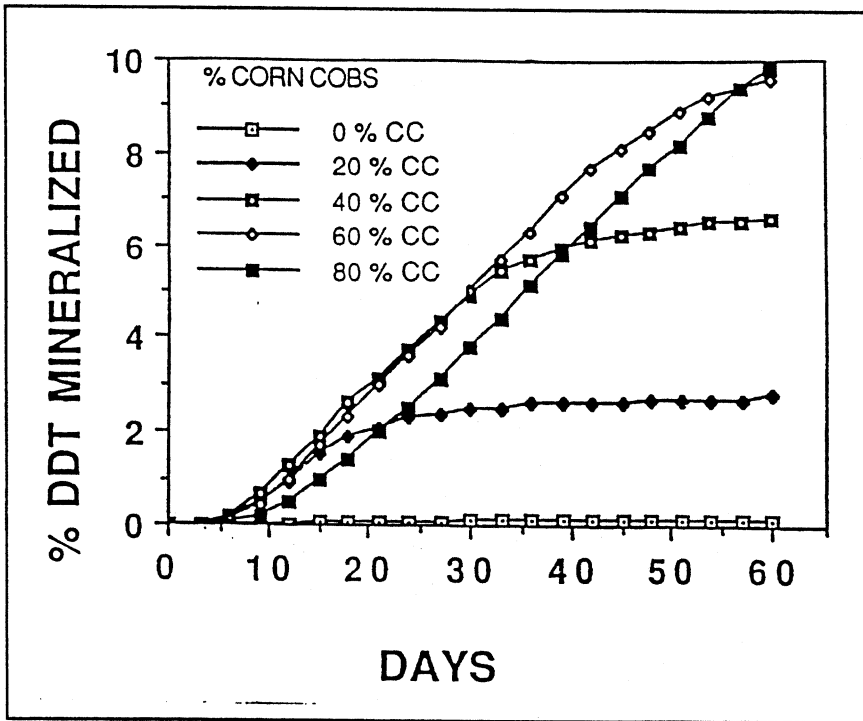
Days of incubation	Glucose (56 mM)	DDT concentration (µM)	% Degradation
0	+	4.8	0
30		2.3	48
31	+		
48		0.4	92
61	+		
75		< 0.048	> 99

De meeste gegevens omtrent de afbraak van xenobiotica door *P. chrysosporium* zijn verkregen uit onderzoek dat is uitgevoerd in goed gedefinieerd (vloeibaar) medium, waarbij glucose als C-bron wordt toegevoegd [18, 20, 46]. Bij toepassing in een afvalverwerkingssysteem zullen eenvoudige koolhydraten als glucose niet aanwezig zijn en verdient het wellicht de voorkeur om met slurysystemen of 'solid state fermentation' (SSF) systemen te werken. De laatste optie is in verband met hun levenswijze voor schimmels het meest aantrekkelijk. Fernando et al. [40] hebben de afbraak [¹⁴C]DDT door *P. chrysosporium* in bodemmonsters onderzocht. Het betrof een bodem bestaande uit zand (19%), slib (54%) en klei (27%), met een organisch koolstofgehalte van 2%. Aangezien co-metabolisatie belangrijk is werden experimenten uitgevoerd met toevoeging van substraat. In vloeibaar medium bleek tarwestro een hoge DDT-mineralisatiegraad te bewerkstelligen. Toevoeging van tarwestro aan incubaties met bodemmonsters was niet succesvol [40]. Daarentegen bleek toevoeging van gemalen maïskolf betere resultaten op te leveren. De invloed van het percentage toegevoegde maïskolven is

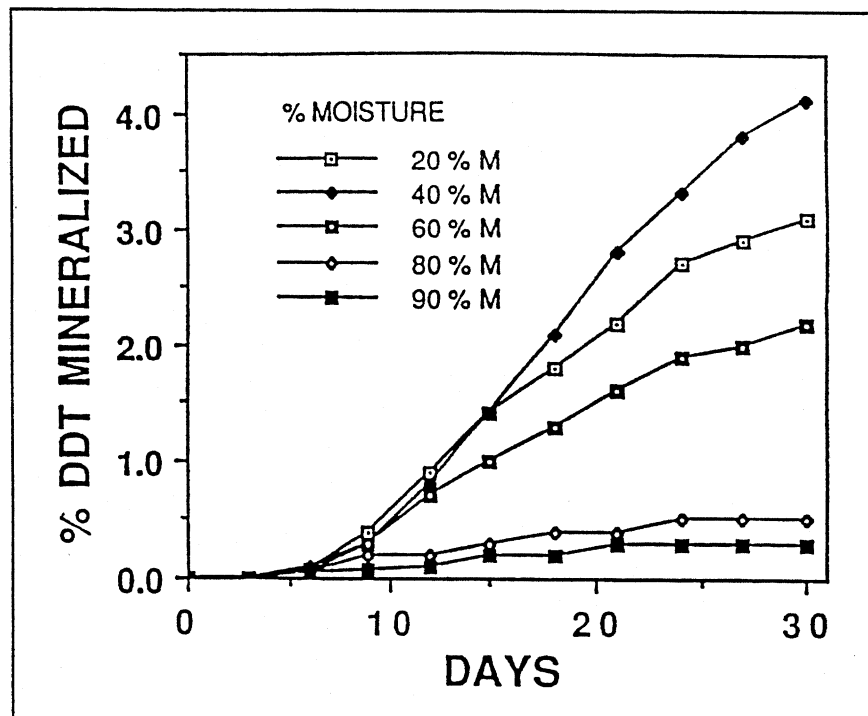
weergegeven in Figuur 9. Het lineaire verband tussen DDT-mineralisatie en de concentratie van de C-bron bleek gerelateerd aan de relatieve groei van de schimmel [40]. De auteurs hebben tevens de relatie tussen het bodemvochtgehalte en de DDT-mineralisatie onderzocht (Figuur 10). De beste resultaten werden behaald bij een vochtigheidsgraad van 40% (w/w). Hogere vochtigheid resulteerde in een afname van de groei van de schimmel, en daarmee van de mineralisatie [40].



Figuur 8. Route voor de biodegradatie van DDT door *P. chrysosporium* [19].



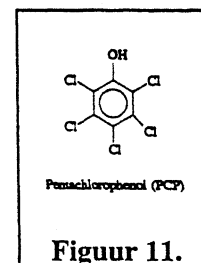
Figuur 9. Effect van de concentratie gemalen maïskolf als koolstofbron voor de mineralisatie van ^{14}C -DDT door *P. chrysosporium* in een bodem/maïskolf-matrix gedurende een periode van 60 dagen [40]. Incubaties werden gestart met 1,25 nM ^{14}C -DDT.



Figuur 10. Effect van het vochtgehalte in een bodem/maïskolf-matrix op de mineralisatie van ^{14}C -DDT door *P. chrysosporium* [40].

3.2.3. Pentachloorfenol (PCP)

Pentachloorfenol (PCP) is een chemisch produkt dat wordt gebruikt als fungicide (met name voor houtbescherming), insecticide en herbicide [29]. De structuur staat weergegeven in Figuur 11. Het grootschalige gebruik van gechloreerde fenolen als PCP heeft geleid tot het besef dat de verbindingen een serieus milieuprobleem vormen [66]. Gechloreerde fenolen zijn zeer recalcitrant en kunnen leiden tot bioaccumulatie. Gilbert et al. [44] hebben PCP-concentraties tot 175 ppb aangetoond in personen die, beroepsmatig, werden blootgesteld aan houtbeschermingsmiddelen.

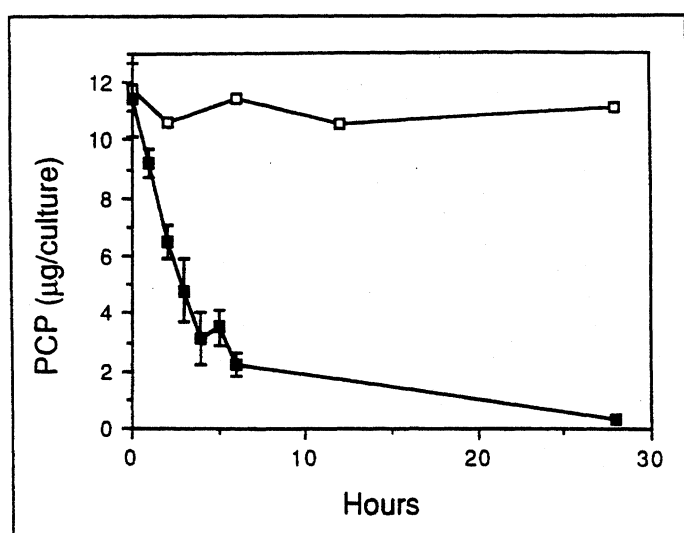


Uit de literatuur is bekend dat PCP kan worden afgebroken door *P. chrysosporium*, zowel in vloeibare media als in bodem [6, 27, 65, 68, 76, 78]. PCP is voor de schimmel zelf ook toxisch [76]. Kweek van *P. chrysosporium* bleek niet mogelijk wanneer cultuurmedium werd geënt met sporen in de aanwezigheid van PCP-concentraties hoger dan 4 ppm. Afbraak werd pas geconstateerd wanneer het xenobioticum werd toegevoegd nadat de schimmel een myceliummat had gevormd. Op deze wijze was afbraak van PCP tot concentraties van 500 ppm mogelijk, waarbij de hoeveelheid gemineraliseerd PCP toenam bij toename van de initiële PCP-concentratie (Tabel 5) [76]. PCP-afbraak door *P. chrysosporium* in een vloeibaar, N-arm medium wordt geïllustreerd in Figuur 12 [76]. PCP-mineralisatie blijkt ook op te treden wanneer *P. chrysosporium* wordt gekweekt onder N-rijke (non-ligninolytische) condities (Tabel 5; Figuur 13) [76]. Dit wijst erop dat naast het lignine degraderende systeem nog een ander systeem betrokken is bij de afbraak van PCP.

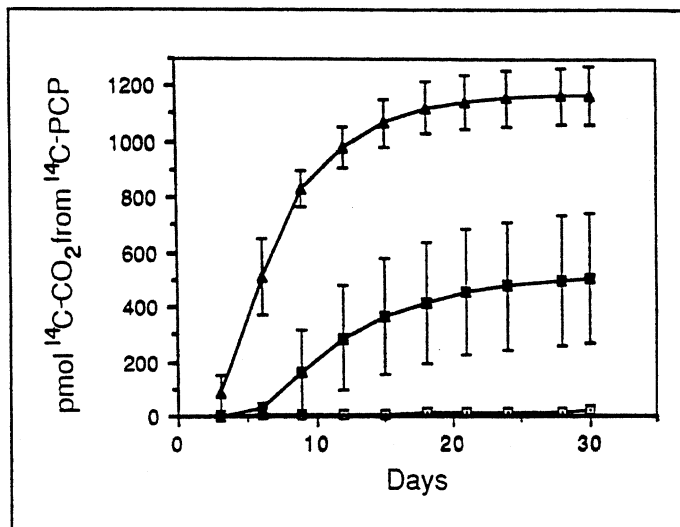
Table 5. Effect of initial PCP-concentration on the rate of its mineralization by *P. chrysosporium* (adapted from [76]).

PCP-conc. (mg/l) ¹	PCP mineralized in 24 days (nmol)		% of initial PCP conc. mineralized	
	N-limited	N-sufficient	N-limited	N-sufficient
1	19	6	50	15
10	160	42	42	11
100	851	285	22	8
500	1349	931	7	5

¹ PCP was added to 6-day-old cultures

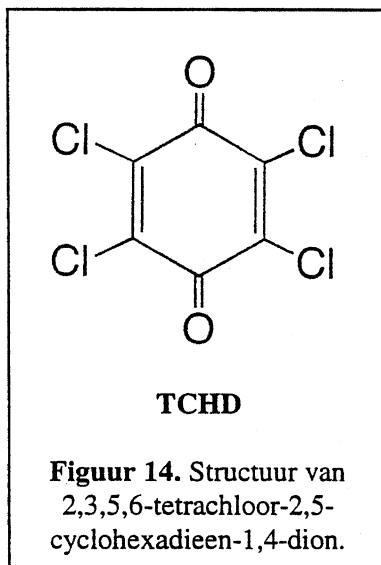


Figuur 12. PCP-afbraak door N-gelimiteerde (1,2 mM ammoniumtartraat) cultures van *P. chrysosporium* (■) [76]. Als controle werd een onbeënt kweek-medium (□) genomen.



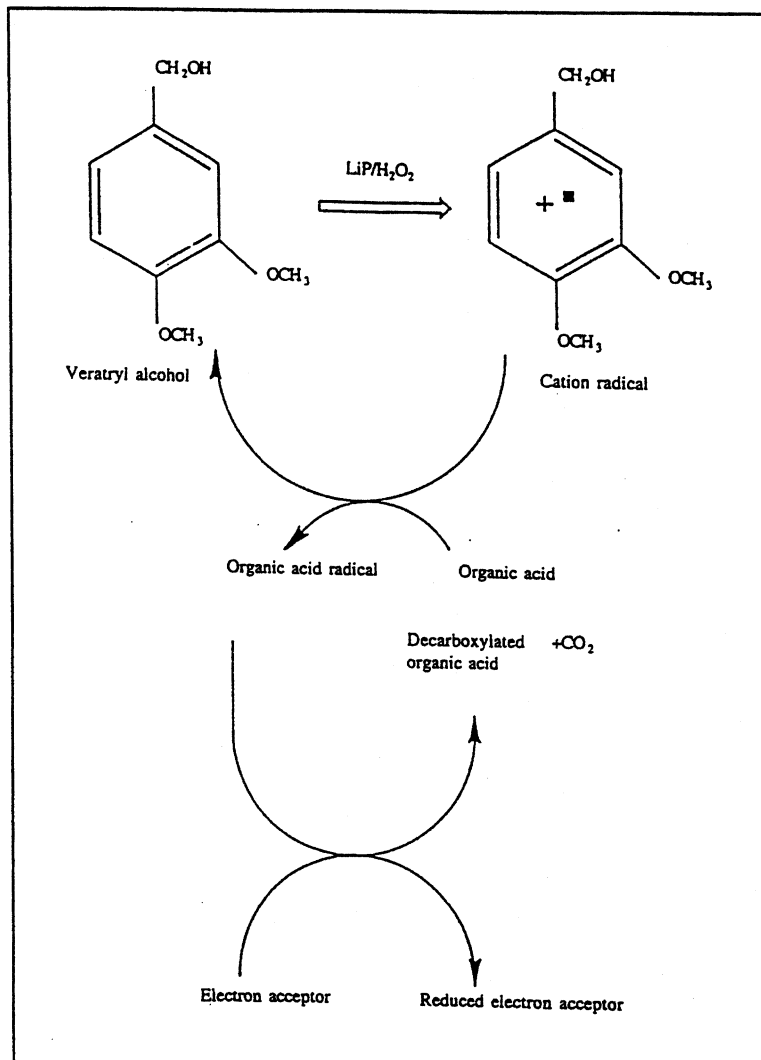
Figuur 13. Effect van de N-concentratie op de mineralisatie van ^{14}C -PCP (5 nmol) door *P. chrysosporium* [76]. Cultures werden geïncubeerd in aanwezigheid van 1,2 mM (▲, N-arm) of 12 mM (■, N-rijk) ammonium tartraat. Steriele controle (□).

Het mechanisme voor het omzeilen van de letale werking van PCP is niet bekend. Maar gezien het feit dat het xenobioticum een sterke remmer is van de oxidatieve fosforylering, is het waarschijnlijk dat, ten gevolge van een te hoge PCP-concentratie, niet in de minimale energiebehoefte voor nieuwe groei vanuit sporen kan worden voorzien [76].



Er bestaat bewijs dat het lignine degraderende enzymesysteem van de schimmel een rol speelt bij de afbraak van PCP [76, 69]. De mineralisatie komt op gang met het verschijnen van het ligninolytisch systeem, en verloopt in de tijd analoog aan de mineralisatie van lignine onder N-gelimiteerde omstandigheden [20, 60]. Bovendien wordt de mineralisatie van PCP onder N-rijke condities geremd [76]. Mileski et al. [76] leverden, naast deze indirecte bewijzen voor de betrokkenheid van het lignine-degraderende systeem, direct bewijs hiervoor. Zij toonden namelijk aan dat een gezuiverd LiP van *P. chrysosporium* in aanwezigheid van H_2O_2 de initiële oxidatie van PCP katalyseerde, waarbij TCHD (2,3,5,6-tetrachloor-2,5-cyclohexadien-1,4-dion ofwel 2,3,5,6-tetrachloor-benzoquinon (Figuur 14), werd gevormd. Het enzym werd echter snel geïnactiveerd ten gevolge van ophoping van LiP III. Chung and Aust [28] vonden dat toevoeging van veratrylalcohol (VA) een

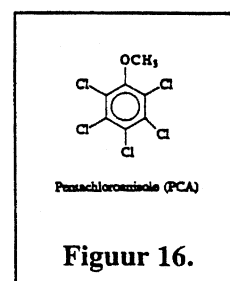
positief effect had op de PCP-oxidatie. De auteurs geven daarbij aan dat VA, in de vorm van het kation radicaal (VA^+), niet alleen als electron-mediator (zie paragraaf 2.2.) optreedt maar ook reactivatie van LiP III bewerkstelligt. Zowel de directe oxidatie als de VA-gedreven oxidatie van PCP levert het TCHD als produkt [28]. Het is tot nu toe echter nog niet duidelijk of de oxidatie van PCP naar TCHD *in vivo* de belangrijkste route in de PCP-afbraak is. Het moet hier worden opgemerkt dat PCP zelf al een sterk geoxideerde verbinding is, zodat oxidatie ervan door het ligninolytisch systeem onmogelijk lijkt. Een oplossing hiervoor ligt in de mogelijkheid van VA^+ organische zuren (als oxalaat) te oxideren, waarbij een anion-radicaal gegenereerd wordt [8] (Figuur 15). Dit reduceert in een volgende stap het sterk geoxideerde xenobioticum (PCP), waarbij een chlooratoom wordt afgesplitst [8], gevolgd door de oxidatie naar TCHD.



Figuur 15. Mechanisme voor LiP-afhankelijke reductie van verbindingen [9]. Tot de organische zuren welke kunnen optreden als reductoren voor het veratryl alcohol kation radicaal behoren EDTA en oxalaat (uitgescheiden door basidiomyceten).

Zoals al vermeld treedt ook afbraak van PCP op wanneer *P. chrysosporium* aan bodemmonsters wordt toegevoegd. Het entmateriaal bestaat in het algemeen uit zaagsel [78], espsnippers [65] of gemalen maïskolf [27], waarop de schimmel is voorgegroeid. Een belangrijk voordeel van deze entmethode is onder meer het feit dat PCP door deze materialen kan worden geadsorbeerd, zodat de direct beschikbare concentratie van het xenobioticum lager is en minder remming in de groei van de schimmel optreedt (zie hierboven). Indien het organische-stof-gehalte erg laag is wordt, als bron van organisch koolstof voor schimmelgroei en -activiteit, bijvoorbeeld veengrond toegevoegd [65]. Okeke et al. [78] hebben op laboratoriumschaal de invloed van een aantal parameters op de biotransformatie van PCP in bodem onderzocht. PCP-verwijdering door *P. chrysosporium* bleek toe te nemen bij temperatuurverhoging en optimaal bij een temperatuur van 25°C (hoger niet getest), pH 4 en een vochtgehalte van ongeveer 50%. Er werd een positieve correlatie gevonden tussen de PCP-afname en het vochtgehalte van de bodem. De auteurs hebben alleen de afname van PCP in de bodem bestudeerd. Vorming van (intermediaire) produkten werd niet bekeken [78].

Er is weinig bekend over de identiteit van de intermediairen die door *P. chrysosporium* vanuit PCP worden gevormd [6]. Het belangrijkste produkt is PCA (pentachlooranisol, zie Figuur 16), waarbij de fenolgroep van PCA wordt gemethyleerd [77]. Deze omzetting treedt mogelijk op als detoxificatiemechanisme, omdat PCA geen inhibitor van de oxidatieve fosforylering is en daarmee voor de wit-rotter minder toxisch dan PCP [6,



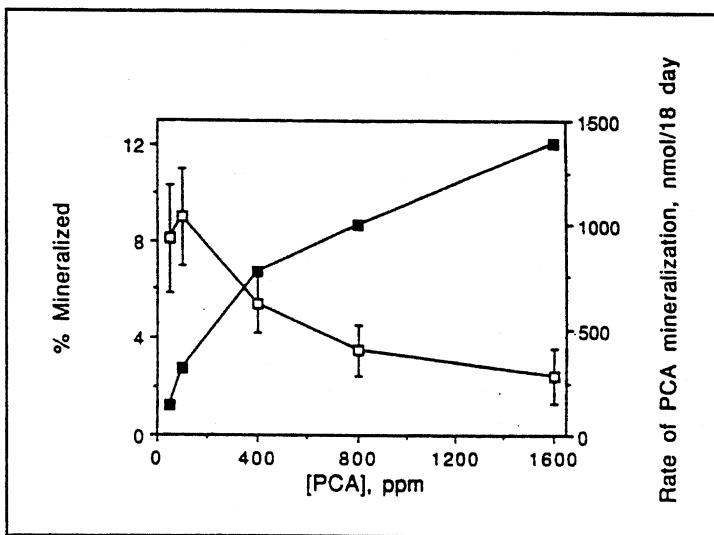
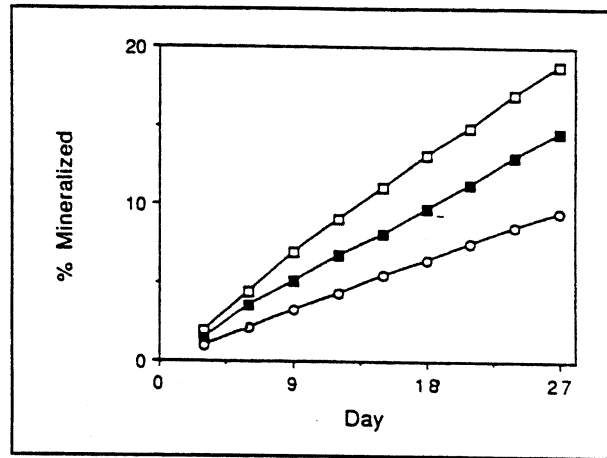
Figuur 16.

40]. PCA is slecht oplosbaar in water (0,2 ppm) en vormt daardoor nauwelijks een bedreiging voor verontreiniging van grondwater [30, 76]. Hoewel PCA-vorming vanuit PCP altijd wordt gevonden, kan de relatieve omzetting naar PCA afhankelijk van de aangelegde condities nogal verschillen. Zo rapporteerden Lamar en Dietrich [65] een studie naar de in situ afbraak van PCP (ca. 300 ppm) in bodem m.b.v. *P. chrysosporium* of *P. sordida*, onder suboptimale omstandigheden (10-20°C, geen constante beluchting). Zij constateerden dat slechts 9-14% van het PCP in een periode van 15-22 dagen werd omgezet in PCA en ze vonden geen andere extraheerbare intermediären. Op basis van eerdere bevindingen [67] dat er nauwelijks PCP-verlies optrad via mineralisatie en vorming van vluchtige producten, concludeerden de auteurs dat de overgrote meerderheid van het PCP gedurende het afbraakproces was omgezet in niet-extraheerbare, bodemgebonden producten. Waarschijnlijk worden de PCP-intermediären, net als in de natuur voorkomende fenolische verbindingen, irreversibel aan het organisch materiaal gekoppeld ten gevolge van polymerisatiereacties [10]. Over de stabiliteit van deze hybride polymeren (xenobioticum-humuszuur) onder natuurlijke omstandigheden is niets bekend, maar onderzoek met kunstmatig gemaakte hybride polymeren suggereert dat xenobiotica, waaronder ook PCP zelf, gebonden aan humusmateriaal relatief stabiel zijn [31]. Hierbij is de bodem-pH tevens van invloed op de hechting. Adsorptie van PCP aan bodemdeeltjes is sterker naarmate de pH in de bodem lager is [26]. *P. chrysosporium* is wel in staat om gechloroerde fenolen in hybride polymeren met dezelfde snelheid als de humuskoolstof te mineraliseren [47]. Het vrijkomen van de xenobiotica uit de hybride polymeren onder natuurlijke omstandigheden is echter een zeer langzaam proces en heeft daarmee waarschijnlijk geen nadelig effect op het milieu. In tegenstelling tot de resultaten van Lamar en Dietrich [65] vonden Chung en Aust [27] een duidelijk hogere PCP-omzetting naar PCA door *P. chrysosporium*. Het betreft hier echter een laboratoriumstudie, waarbij bodemmonsters onder optimale condities voor PCP-afbraak konden worden geïncubeerd. De incubaties werden bij een temperatuur van 39°C en onder goede beluchting uitgevoerd. Uit het onderzoek bleek ook dat er na 18 dagen een substantiële mineralisatie vanuit PCP was opgetreden (Tabel 6). Tijdens deze incubatieperiode was PCA geaccumuleerd tot 10-40% van de initiële hoeveelheid PCP en was er geen PCP meer aanwezig. Aangezien er na deze incubatieperiode nog steeds een lineair voortschrijdende mineralisatie werd waargenomen (Figuur 17) werd geconcludeerd dat de gemineraliseerde verbinding PCA was [27]. Dit werd bevestigd door de bevinding dat de wit-rot schimmel ook PCA bleek te kunnen afbreken (Figuur 18) [27]. Het feit dat bij PCP-degradatie in bodem m.b.v. *Phanerochaete* spp. nagenoeg geen vluchtige of wateroplosbare (toxische) intermediären ontstaan is erg belangrijk. Verontreiniging van lucht en grondwater blijft bij gebruik van deze wit-rotter tot een minimum beperkt [27].

Table 6. Mass balances for pentachlorophenol degradation by *P. chrysosporium* in non-sterile soil day 18 (adapted from [27]).

Concentration (ppm)	% Recovery	Percentage of total radioactivity added				
		Solvent		Particulate	Aqueous	¹⁴ CO ₂
		PCP	PCA			
100	70	0	40	17	0.45	13
800	75	44	10	12	0.22	9

Figuur 17. Mineralisatie van PCP in bodemmonsters door *P. chrysosporium* [27]. De incubaties werden uitgevoerd in aanwezigheid van 100 (□), 400 (■) en 1600 (○) ppm PCP.

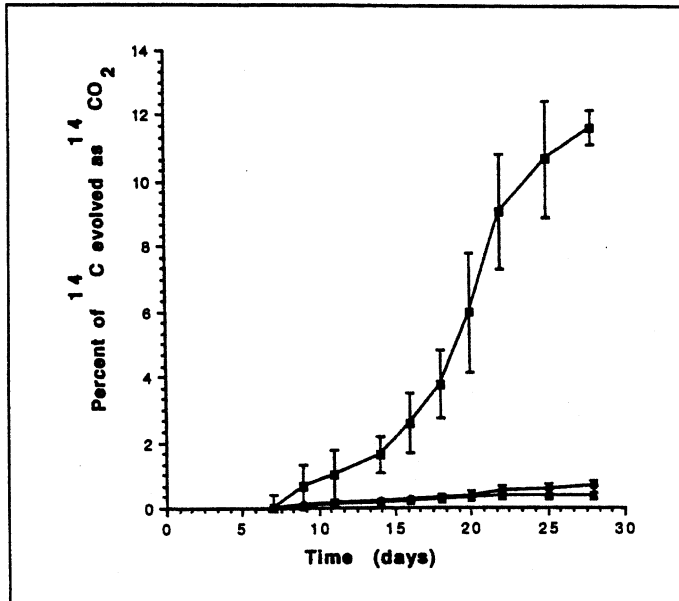


Figuur 18. Effect van de PCA-concentratie op de PCA-mineralisatiesnelheid in bodemmonsters door *P. chrysosporium* [27]. □, percentage mineralisatie na 18 d; ■, mineralisatiesnelheid.

3.2.4. PCB's (polychloorbifenylen)

De afbraak van PCB's door bacteriën is veelvuldig bestudeerd [1, 42], maar over mogelijkheden van schimmels om diverse typen PCB af te breken of de door deze organismen gebruikte afbraakmechanismen is relatief weinig bekend.

Hoewel vast staat dat *P. chrysosporium* in staat is een aantal PCB's te mineraliseren [92, 20, 33] is de rol van het ligninolytisch enzymstelsel in PCB-degradatie door de wit-rot schimmel niet duidelijk. Eaton [35] vond dat PCB-mineralisatie evenredig was met de PCB-concentratie (tot 1000 ppm). Daarnaast bleek uit zijn experimenten dat er een relatie bestaat tussen de lignine afbraak en de degradatie van PCB. Op basis van deze bevindingen werd door Eaton geconcludeerd dat de enzymen van het ligninolytisch systeem een rol spelen in de PCB-afbraak. Thomas et al. [86] konden daarentegen geen correlatie aantonen tussen PCB-afbraak en de productie van lignine-degraderende enzymen, hetgeen volgens de auteurs een directe rol van deze enzymen in het PCB-metabolisme uitsluit. Wel werd gevonden dat het begin van PCB-mineralisatie samenviel met het begin van de secundaire groeifase van *P. chrysosporium* [86]. Dit suggereert inductie van bepaalde, voor PCB-afbraak benodigde, enzymen die niet door exponentieel groeiende cellen worden geproduceerd [86].



Figuur 19. Mineralisatie van 4,4'-[¹⁴C]DCB (■), 3,3',4,4'-[¹⁴C]TCB (●) en 2,2',4,4',5,5'-[¹⁴C]HCB (▲) door *P. chrysosporium* in vloeibare cultures [33]. Zie voor de betekenis van de afkortingen Tabel 7.

Table 7. Mineralization of biphenyl and PCBs by cultures of *P. chrysosporium*.

Compound	% Mineralization	Reference
4,4'-dichlorobiphenyl (DCB)	12	[33]
3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB)	-	[33]
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (HCB)	-	[33]
biphenyl	23	[86]
2-chlorobiphenyl	16	[86]
2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl	10	[86]
2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl	10	[86]
3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl	<1	[20]

Uit verschillende onderzoeken is gebleken dat in het algemeen de mineralisatiegraad van PCB's door *P. chrysosporium* afneemt naarmate er meer chlooratomen in het molecuul aanwezig zijn [20, 33, 35, 86, 101]. Dit wordt geïllustreerd aan de hand van Tabel 7 en Figuur 19. Dietrich et al. [33] vonden een mineralisatiegraad voor 4,4'-dichloorbifenyl (4,4'-DCB) van ca. 12%, terwijl 3,3',4,4'-TCB en 2,2',4,4',5,5'-hexachloorbifenyl (2,2',4,4',5,5'-HCB) nauwelijks werden gemineraliseerd. Thomas et al. [86] rapporteerden mineralisatiewaarden voor bifenyl, 2-chloorbifenyl en 2,2',4,4'-tetrachloorbifenyl (2,2',4,4'-TCB) van respectievelijk 23%, 16% en 10%. Naast het effect van het aantal chlooratomen blijkt ook dat hun posities in het PCB-molecuul van invloed zijn op de afbraak door de wit-rotter. Zo werd, onder vergelijkbare omstandigheden, in een periode van 30 dagen een mineralisatiegraad van 10% en minder dan 1% van respectievelijk 2,2',4,4'-TCB en 3,3',4,4'-TCB waargenomen [20, 86]. Omdat informatie met betrekking tot de enzymatische basis van PCB-afbraak door wit-rot schimmels tot nu toe ontbreekt, is een mechanistische interpretatie van het fenomeen nog niet mogelijk [33].

PCB-verwijdering door gebruik te maken van *P. chrysosporium* kan niet volledig, of zelfs helemaal niet, worden toegeschreven aan metaboliserende activiteit van de schimmel. Er is vaak ook sprake van non-specifieke adsorptie aan schimmel biomassa [33, 35, 86] of van vervluchtiging [33]. Dit wordt geïllustreerd aan de hand van Tabel 8, waarin de verdeling van ¹⁴C-componenten is weergegeven na incubatie van 4 weken van de wit-rot schimmel in een medium met DCB, TCB of HCB.

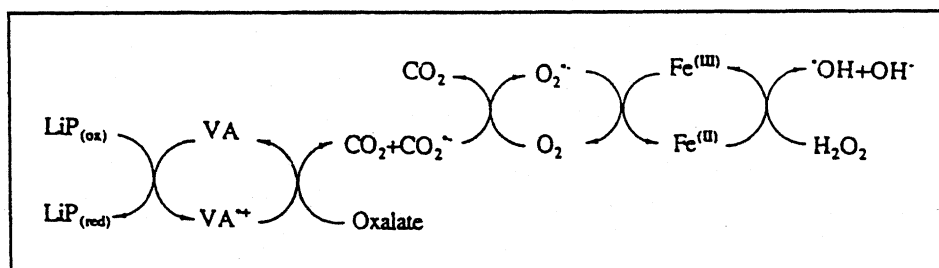
Table 8. Recoveries^a of 4,4'-[¹⁴C]DCB, 3,3',4,4'-[¹⁴C]TCB, and 2,2',4,4',5,5'-[¹⁴C]HCB ([33]).

PCB ^b	Inoculation ^c	¹⁴ C recovery (mean ± SD [%]) in fraction						
		Mineralized ^d	Volatilized	Extractable ^e	Nonextractable	Wash	Hypha	Total
DCB	+	11.7 ± 2.3	16.9 ± 1.7	20.2 ± 1.1	8.9 ± 1.3	3.4 ± 0.8	11.3 ± 2.4	74.7 ± 3.7
	-	^f	46.9 ± 7.0	1.8 ± 0.6	1.6 ± 0.9	4.6 ± 0.2	-	57.3 ± 7.9
TCB	+	-	-	6.2 ± 0.7	-	15.3 ± 1.7	61.1 ± 5.3	84.2 ± 5.4
	-	-	1.6 ± 0.2	3.2 ± 0.9	-	54.3 ± 1.9	-	62.5 ± 6.6
HCB	+	-	-	3.3 ± 0.4	-	20.1 ± 1.5	62.1 ± 8.9	85.0 ± 3.7
	-	-	-	1.3 ± 0.4	-	65.8 ± 5.2	-	63.4 ± 9.0

- ^a Percent recoveries represent the means ± standard deviations of five replicates for inoculated cultures and four replicates for noninoculated cultures.
- ^b DCB, 4,4'-[¹⁴C]DCB; TCB, 3,3',4,4'-[¹⁴C]TCB; HCB, 2,2',4,4',5,5'-[¹⁴C]HCB.
- ^c Inoculation of liquid medium with *P. chrysosporium*.
- ^d Evolved and collected as ¹⁴CO₂.
- ^e Extracted with ethyl acetate.
- ^f -, <1% of total ¹⁴C added.

Tot nu toe is er slechts één publicatie verschenen met betrekking tot afbraakproducten van PCB's door een wit-rot schimmel [33]. Dietrich et al. [33] bestudeerden de afbraak van 4,4'-DCB door *P. chrysosporium* in vloeibaar medium. Zij toonden aan dat gedurende de incubatie accumulatie optrad van de intermediären 4-chloorbenzoëzuur (4-CBA) en 4-chloorbenzylalcohol (4-CBAlc). Deze werden echter verder afgebroken tot (niet geïdentificeerde) producten met een polairder karakter.

Net als DDT en lindaan (γ-HCH) zijn PCB's met een hoge graad van chlorering niet direct te oxideren door lignine peroxidases [101]. Dit is het gevolg van de sterk geoxideerde staat van dergelijke xenobiotica. Het is waarschijnlijk dat er eerst een reductieve dechlorering plaats dient te vinden, voordat verdere afbraak mogelijk is [101]. Daarnaast is het mogelijk dat OH-radicalen, gevormd met behulp van LiP (Figuur 20), door *P. chrysosporium* wordt gebruikt voor de reductie van het aantal chlooratomen in PCB's [9].



Figuur 20. Vorming van OH-radicalen door LiP [9].

3.2.5. HCH's (hexachloorhexaan)

Het alkylhalide insecticide lindaan (γ -HCH) is een van de HCH-isomeren. De structuur van lindaan is weergegeven in Figuur 21 [56]. Ook dit xenobioticum kan door *P. chrysosporium* onder ligninolytische condities worden gemineraliseerd [20, 56, 79], zoals al geïllustreerd in Figuur 4 (paragraaf 3.2.1.). Kennedy et al. [56] tonen mineralisatie van lindaan door de wit-rot schimmel aan zowel in vloeibare cultures als in cultures die grond bevatten. In het eerste geval was glucose de koolstofbron, terwijl in de cultures met grond gemalen maïskolf als substraat werd toegevoegd. Net als beschreven bij de afbraak van DDT in grondmonsters (zie paragraaf 3.2.2.) werd de gemalen maïskolf vooraf met *P. chrysosporium* begroeid en fungeerde daarmee als inoculum in experimenten uitgevoerd met grondmonsters [56]. Bij een incubatietemperatuur van 39°C werd na 30 (vloeibaar medium) cq. 60 (grond/maïs-matrix) dagen ongeveer 23% van de toegevoegde hoeveelheid ^{14}C -label (100% is ca. 1,5 ppm lindaan) in de vorm van $^{14}\text{CO}_2$ teruggevonden, duidend op een hoge mineralisatiegraad (Tabel 9). Ook werden afbraakproducten van lindaan gevonden, zowel wateroplosbare als niet-wateroplosbare. Over de identiteit van de metabolieten wordt door de auteurs echter geen uitspraak gedaan [56]. Gezien de mineralisatie van uniform ^{14}C -gelabeld lindaan kan wel worden vermeld dat ringopening een van de stappen in de degradatie is [56]. Er zijn tevens aanwijzingen dat reductiestappen bij lindaan-degradatie een rol spelen, maar het is niet bekend of lindaan kan worden afgebroken door LiP-gecatalyseerde reductieve reacties of door andere reductieve enzymen van *P. chrysosporium* [101].

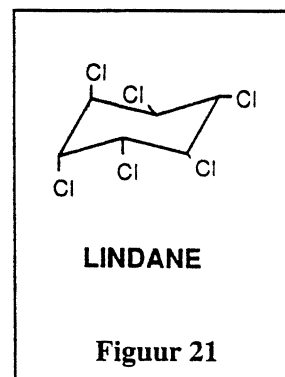


Table 9. Mass balance of ^{14}C radioactivity from *P. chrysosporium* 60-day soil and 30-day liquid cultures incubated with lindane (adapted from [56]).

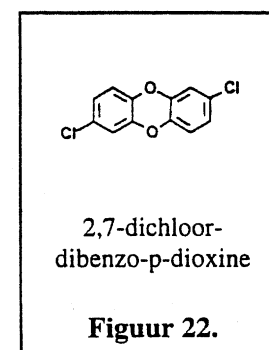
Culture matrix ^a	% Recovery	Mass balance data (% per fraction of total radioactivity added)					
		Solvent		Particulate	Aqueous	$^{14}\text{CO}_2$	% Disappearance ^b
		% Original	% Metabolites				
Soil (4.7)	62	27.3	6.5	0.9	4.6	22.8	34.7
Liquid (5.3)	79.5	26.0	14.6	1.2	14.3	23.4	53.5

^a Numbers in parentheses indicate mass (nmoles) of radiolabeled compound added per culture.

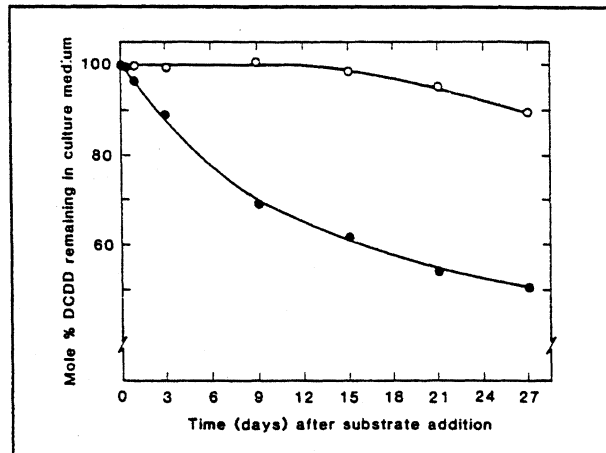
^b The percent disappearance represents the amount of radioactivity recovered which was not parent compound.

3.2.6. Dioxines

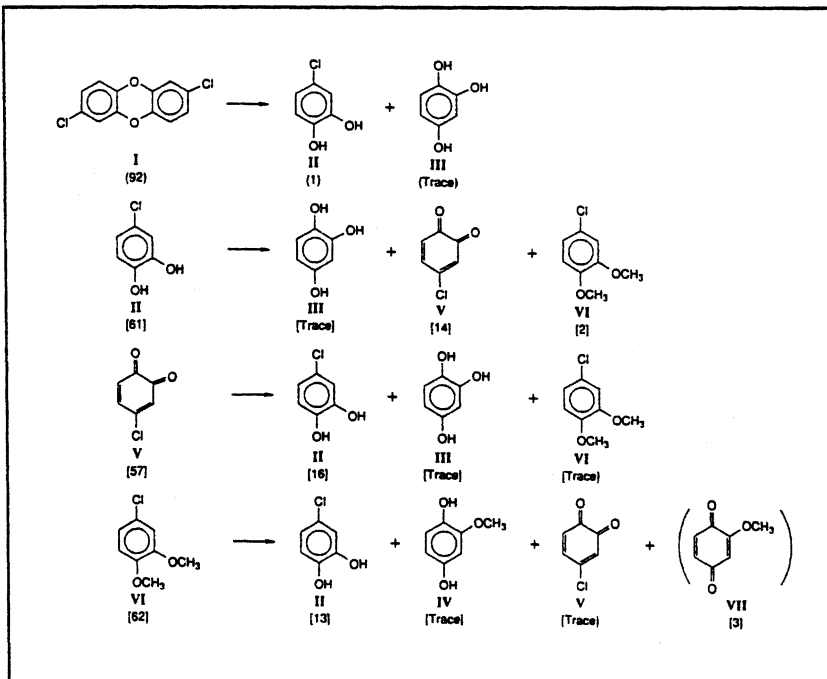
Dioxine is een verzamelnaam voor diverse polychloor-dibenzo-para-dioxines (PCDD's). Hiertoe behoren 2,7-dichloordibenzo-p-dioxine (2,7-DCDD; Figuur 22 [79]) en 2,3,7,8-tetrachloordibenzo-p-dioxine (2,3,7,8-TCDD). Hoewel al langer bekend is dat *P. chrysosporium* in staat is 2,3,7,8-TCDD te mineraliseren [20, 79] is er weinig informatie met betrekking tot de mechanismen en routes voor de afbraak van PCDD's. De betrokkenheid van ligninolytische enzymen van wit-rot schimmels bij de degradatie van dioxines wordt algemeen geaccepteerd sinds de ontdekking van Hammel et al. [48] dat bij de activering van dibenzo-p-dioxine en 2-chloordibenzodioxines, in aanwezigheid van ligninase, kation radicalen worden gevormd. Daarnaast treedt, net als bij de



hierboven besproken xenobiotica, remming van dioxine-degradatie op onder N-rijke condities (Figuur 23) [91], hetgeen ook op een rol van het ligninolytisch enzymstelsel duidt.



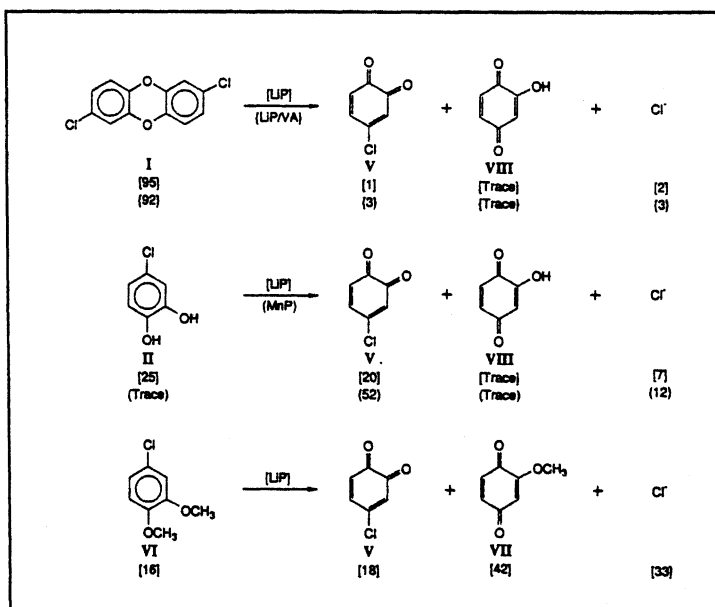
Figuur 23. Effect van de N-concentratie op de afbraak van 2,7-DCDD door *P. chrysosporium* [91]. De incubaties werden uitgevoerd in aanwezigheid van 1,2 mM (●) of 12 mM (○) ammonium tartraat. Het DCDD werd toegevoegd aan 6-dagen oude cultures.



Figuur 24. Geïdentificeerde metabolieten afkomstig van afbraak van DCDD en DCDD-intermediären door *P. chrysosporium* [91].

Valli et al. [91] zijn de eerste onderzoekers geweest die het metabolisme van 2,7-DCDD door *P. chrysosporium* uitvoerig hebben onderzocht en die in detail de rol van o.a. LiP en MnP bespreken. Het schema voor het metabolisme is afgeleid uit resultaten van diverse experimenten. Zo werden cultures niet alleen geïncubeerd met het xenobioticum (2,7-DCDD) maar tevens met de primaire en secundaire metabolieten ervan (Figuur 24). Daarnaast werden incubaties uitgevoerd met gezuiverde LiP- en MnP-preparaten (Figuur 25). De door de auteurs voorgestelde route voor 2,7-DCDD staat weergegeven in Figuur 26. In eerste instantie wordt de dioxine-ring van 2,7-DCDD (I) onder invloed van LiP oxidatief opengebroukt, waarbij 4-chloor-1,2-benzoquinon (V), 2-hydroxy-1,4-benzoquinon (VIII) en chloride worden gevormd. Vervolgens wordt het intermediair V gereduceerd tot 1-chloor-3,4-dihydroxybenzeen (II). Dit intermediair wordt in een volgende stap gemethyleerd onder vorming van 1-chloor-3,4-dimethoxybenzeen (VI). Beide reacties worden niet door LiP of MnP gekatalyseerd en vinden waarschijnlijk

intracellulair plaats [91]. Metaboliet II kan tevens worden geoxideerd, door LiP of MnP, naar 2-hydroxy-1,4-benzoquinon (VIII). Intermediair VI kan met behulp van LiP worden geoxideerd tot 2-methoxy-1,4-benzoquinon (VII) en chloride, waarna een reductiestap naar het hydroquinon (IV) plaats vindt. Dit intermediair kan door LiP of MnP worden geoxideerd naar 4-hydroxy-1,2-benzoquinon [90], gevolgd door een reductie naar 1,2,4-trihydroxybenzeen (III) [90]. Het andere initiële degradatieproduct van 2,7-DCDD, namelijk 2-hydroxy-1,4-benzoquinon (VIII), ondergaat eveneens een reductie tot verbinding III, een omzetting die zeer waarschijnlijk intracellulair optreedt [90]. De ringstructuur van dit sleutelintermediair wordt vervolgens intracellulair opgebroken en verder gemetaboliseerd naar kooldioxide. Het dient te worden opgemerkt dat hoewel het metabolisme volgens het schema gepresenteerd in Figuur 26 verloopt, niet alle intermediairen ook daadwerkelijk in cultures van *P. chrysosporium* worden waargenomen [91]. In kweken geïncubeerd met 2,7-DCDD (Figuur 24) werden alleen chloorcatechol (II) en sporen van 1,2,4-trihydroxybenzeen (III) waargenomen [91]. Beide verbindingen zijn goed wateroplosbaar, zodat bij *in situ* gebruik van de wit-rotter rekening moet worden gehouden met contaminatie van grondwater.



Figuur 25. Geïdentificeerde producten van de oxidatie van DCDD en verscheidene inter-mediairen door gezuiverd LiP en MnP [91].

4. Biodegradatie van xenobiotica door *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* en *Coprinus comatus*

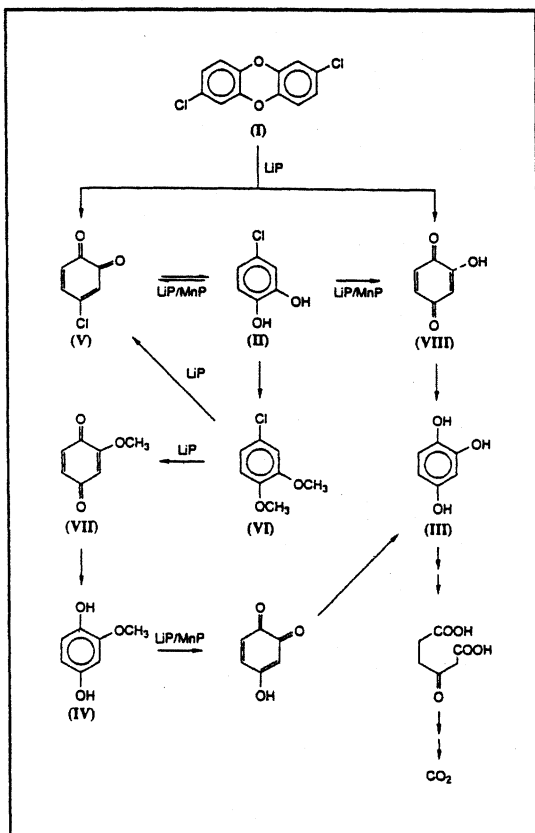
In het geval van *P. ostreatus* is wel enige informatie beschikbaar met betrekking tot de capaciteit van de schimmel om xenobiotica af te breken. Deze informatie beperkt zich echter tot polycyclische aromaten [71] en de verbindingen DDT en PCB's. In het kader van dit project wordt alleen ingegaan op de twee laatstgenoemden.

4.1. PCB-degradatie door *Pleurotus ostreatus*

Šašek et al. [82] waren niet in staat PCB-afbraak door *P. ostreatus* aan te tonen. In tegenstelling hiermee demonstreerden Zeddel et al. [101] recentelijk dat *P. ostreatus* verschillende PCB's met hoge efficiëntie af kan breken, zowel in vloeibare media als in 'solid state systems' (bodematrices). De auteurs onderzochten de afbraak (bij 25°C) van een mengsel van mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, en hepta-chloorbifenylen. In dit mengsel was 2,4,4'-

trichlorobifenyl de meest prominent aanwezige verbinding (25%). De mate van afbraak bleek negatief te correleren met de chloreringsgraad (Tabel 10), hetgeen hierboven (Tabel 7) ook al voor *P. chrysosporium* is beschreven [33, 86]. PCB's tot en met de trichlorobifenylen bleken, ongeacht de posities van de chlooratomen, door *P. ostreatus* na een incubatie van 5 weken in vloeibaar medium nagenoeg volledig te zijn afgebroken [101]. De enige uitzondering hierop werd gevormd door 4,4'-dichlorobifenyl, dat voor ca. 80 % werd afgebroken gedurende deze periode. Mogelijk heeft het betrokken enzymstelsel (of gevormde radicalen) een voorkeur voor aanval op de gesubstitueerde para-positie op aromatische ringen [101]. *P. ostreatus* is eveneens in staat PCB's met meer dan 3 chlooratomen per bifenyl af te breken. Grote verschillen in de mate van afbraak (na 5 weken incuberen; Tabel 10) werden veroorzaakt door verschillen in de posities van de chlooratomen [101]. Het 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobifenyl werd niet afgebroken [101].

Zoals al opgemerkt bestudeerden Zeddel et al. [101] ook de degradatie van PCB's door *P. ostreatus* in bodemmatrices. Incubaties werden uitgevoerd in een glazen buis met Teflon-afluitingen. Een schematische weergave van de gebruikte opstelling is te zien in Figuur 27. Tijdens de solid-state incubaties werd belucht (continue of drie maal 2 uur per dag) met waterverzadigde lucht (600 ml/h). De gebruikte grond (slib-leem) bevatte weinig humus en was zelf niet verontreinigd. Toevoeging van het PCB-mengsel (350-450 ppm totaal) werd op twee verschillende manieren uitgevoerd. In het ene experiment (A) werd het mengsel geadsorbeerd aan houtsnippers en vervolgens met de grond gemengd. In het tweede experiment (B) werd de verontreiniging eerst aan de grond toegevoegd en werden daarna pas de houtsnippers met de gecontamineerde grond gemengd. Tenslotte werd in beide experimenten geënt met *P. ostreatus*, voorgroeid op verkruidde gierst [101].



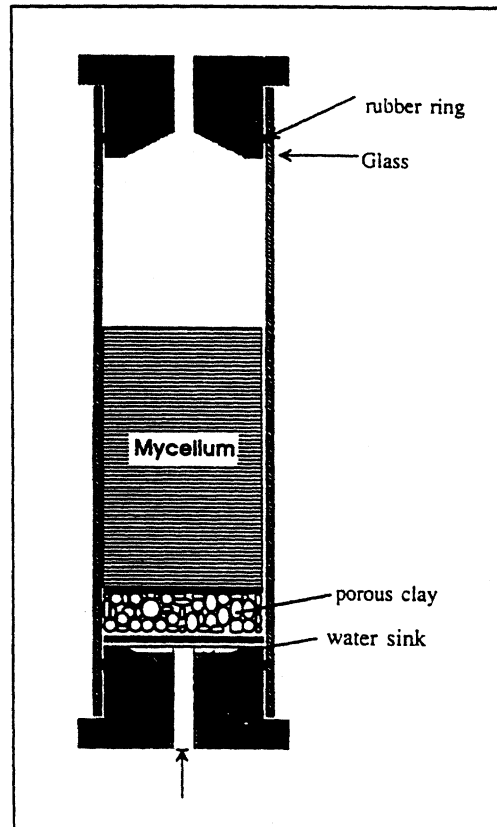
Figuur 26. Voorgestelde route voor afbraak van DCDD door *P. chrysosporium* [91].

Na incubatie (4 of 7 weken) werd de inhoud van de buizen gehomogeniseerd en onderworpen aan een extractieprocedure, waarna m.b.v. GC-MS de PCB-gehalten en -samenstelling bepaald werden. De PCB-afbraaksnelheid in experiment A bleek vergelijkbaar met die in vloeibare cultures [101]: toevoeging van grondmatrices aan PCB-gecoate houtsnippers had geen effect. Echter, de PCB's werden veel langzamer afgebroken wanneer de xenobiotica werden gemengd met grond vóór de toevoeging van houtsnippers (experiment B). Tevens werden er verschillen waargenomen ten aanzien van de snelheden waarmee afzonderlijke componenten werden afgebroken. De oorzaak ligt zeer waarschijnlijk in verschillende hechting van de componenten aan gronddeeltjes [101].

Tot slot dient te worden opgemerkt dat er tot nu toe helaas niet bekend is hoe de afbraak van PCB's door *P.ostreatus* verloopt en welke intermediairen worden gevormd en eventueel ophopen. Zoals reeds vermeld (paragraaf 3.2.4.) is informatie hierover in het geval van wit-rot schimmels zeer beperkt.

Table 10. Degradation potential of *Pleurotus ostreatus* in relation to chlorination grade of PCB (from [101]).

Compound	Degradation
Monochlorobiphenyl	> 99%
Dichlorobiphenyl	> 98%
Trichlorobiphenyl	85 --> 95%
Tetrachlorobiphenyl	20 --> 90%
Pentachlorobiphenyl	up to 60%
Hexachlorobiphenyl	up to 35%
Heptachlorobiphenyl	no degradation



Figuur 27. Schematische weergave van de opstelling gebruikt door Zeddel et al. [101] voor PCB-afbraak door *Pleurotus ostreatus*. Beluchting vond plaats via de onderzijde (zie pijl).

4.2. DDT-afbraak door *P. ostreatus*

Ook DDT kan door *P.ostreatus* worden gemineraliseerd [18]. In een periode van 30 dagen (22-27°C) werd in vloeibaar medium 6% van de initiële 45 ppb DDT gemineraliseerd. De incubaties vonden plaats onder ligninolytische condities (N-gelimiteerd). Groei van de schimmel trad op gedurende de eerste 3 dagen en de mineralisatie kwam na 3-6 dagen op gang en werd in de volledige vervolperiode voortgezet. Non-ligninolytische, N-rijke, cultures werden sterk geremd in de DDT-mineralisatie. Deze resultaten geven aan dat het ligninolytisch enzymstelsel van *P. ostreatus* betrokken is bij deze degradatie.

Het effect van het N-gehalte in het medium op de DDT-mineralisatie is tegenstrijdig met de bevindingen van Kaal et al. [53], die een verhoogde productie van zowel het MnP als het laccase maten bij groei van *P. ostreatus* in stikstofrijke (ammonium of pepton) media. De samenstelling van het medium met ammonium als N-bron was in beide studies nagenoeg identiek. Een belangrijk verschil was echter de pH: Bumpus en Aust [18] kweekten bij pH 4,5 en Kaal et al. bij pH 7,3 [53]. Een belangrijke nog onbeantwoorde vraag is dan ook wat de invloed is van een N-rijk (ammonium) medium met een pH 7,3 op de DDT-afbraak.

Tot nu toe is er niets bekend over de route via welke DDT door *P.ostreatus* wordt gemetaboliseerd. Informatie over gevormde (eventueel ophopende) intermediären is eveneens niet beschikbaar.

Over het gebruik van *A. bisporus* en *C. comatus* bij degradatie van xenobiotica is niets bekend. Het feit echter dat deze organismen lignine-degraderende enzymen produceren duidt erop dat ze zeer waarschijnlijk een belangrijke rol zouden kunnen spelen bij afbraak van dergelijke recalcitrante verbindingen.

5. Conclusie/suggesties

Uit bovenstaande blijkt dat er veel onderzoek is gedaan naar de mogelijkheid van *P. chrysosporium* om xenobiotica af te breken. Over concrete toepassingen van deze wit-rot schimmel is echter weinig bekend. Daarnaast bestaat er het nadeel dat het organisme een relatief hoog temperatuuroptimum heeft voor groei (en xenobioticum afbraak). Bovendien lijken de ligninolytische enzymen alleen onder N-limitatie te worden geproduceerd.

Gezien het feit dat met *Pleurotus* is aangetoond dat afbraak van xenobiotica mogelijk is lijkt er niets op tegen om residuen afkomstig van de productie van eetbare paddestoelen in te zetten ten behoeve van bioremediatie. Er zijn diverse belangrijke redenen om de potentie van de schimmels *P. ostreatus*, *A. bisporus* en *C. comatus* in de afbraak van recalcitrante verbindingen te onderzoeken.

In de eerste plaats produceren deze basidiomyceten extracellulaire enzymen die een zeer belangrijke rol spelen bij de afbraak van lignine, na cellulose de voornaamste component in plantaardige vezels. Met name uit studies met de wit-rotter *Phanerochaete chrysosporium* is gebleken dat dergelijke enzymen eveneens een sleutelrol vervullen bij de afbraak van diverse xenobiotica.

Een tweede belangrijke reden houdt verband met de beschikbaarheid van met name *Pleurotus* (de oesterzwam) en *A. bisporus* (de champignon). Beide eetbare paddestoelen worden op grote schaal op compost geteeld voor menselijke consumptie. De voornaamste champignon-producerende landen zijn de VS, Frankrijk, Nederland, Engeland en Italië. In Nederland is in 1993 circa 190 miljoen kilo champignons geproduceerd [51]. De produkties voor Frankrijk en Engeland waren in datzelfde jaar respectievelijk 216 en 115 miljoen kilo [32]. De enorme produktie van eetbare paddestoelen levert uiteindelijk ook grote hoeveelheden residue, die kunnen oplopen tot 5 kilo per kilo verse champignons [5]. Dit residue bestaat uit restcompost met zowel schimmelmycelium als residuele nutriënten, maar is te 'arm' voor verdere rendabele paddestoelproduktie. Het is dit residue, de zogenaamde spent mushroom compost (SMC) of spent mushroom substrate (SMS), dat mogelijk een toepassing vindt in bodemreiniging. Zo is op laboratoriumschaal SMC met succes als inoculum gebruikt voor de afbraak van het carbamaat insecticide carbaryl [62, 80]. Welke rol de schimmel bij deze afbraak speelt is echter niet onderzocht. SMS heeft op een totaal ander gebied inmiddels een toepassing. Het wordt namelijk o.a., vanwege het hoge gehalte aan kalk, gebruikt voor de behandeling van het zure, Fe- en Mn-rijke, afvalwater uit kolenmijnen [85].

Een derde reden houdt verband met de vorige. Er is namelijk een ruime hoeveelheid technologische kennis voorhanden om op grote schaal *Pleurotus* en *Agaricus* te kweken (tunneltechnologie), welke goed gebruikt kan worden voor het testen van de afbraakcapaciteiten van deze schimmels ten aanzien van diverse xenobiotica.

Daarnaast is het residue dat na commerciële productie van eetbare paddestoelen overblijft sterk gekoloniseerd met schimmelbiomassa en kan daarom in principe goed direct als entmateriaal worden gebruikt. Dat de schimmel nog goed actief is blijkt uit het feit dat in het residue nog voldoende laccaseactiviteit aanwezig is [84]. Omdat maximale activiteiten van de ligninolytische enzymen worden bereikt tijdens substraatkolonisering kan, om deze activiteiten in afgewerkte compost te verhogen, vers lignocellulose substraat (bijv. stro) worden toegevoegd [23]. Uit onderzoek van Laine en Jørgensen [63] is gebleken dat met verse compost (Fase 1 compost) hoge mineralisatiewaarden (tot 56%) kunnen worden bereikt bij de afbraak van pentachloorfenol. Hiervoor zijn actinomyceten in de compost verantwoordelijk. In afgewerkte champignoncompost maken deze bacteriën echter een klein deel uit van de totale hoeveelheid aanwezige microorganismen. Bovendien treedt PCP-mineralisatie door de actinomyceten pas op na een adaptatieperiode van 3 maanden [63]. De bijdrage van deze microorganismen aan de afbraak van xenobiotica m.b.v. afgewerkte champignoncompost zal naar verwachting dan ook laag zijn.

Een vijfde reden betreft de gematigde temperatuur (rond kamertemperatuur) waarbij groei optreedt van de champignon en de oesterzwam. *P. chrysosporium* groeit daarentegen veel beter bij een temperatuur van ongeveer 40°C.

Als zesde reden kan worden vermeld dat de productie van ligninolytische enzymen door zowel *A. bisporus* als *P. ostreatus* wordt gestimuleerd onder stikstofrijke omstandigheden. Compost/schimmel-residuen bevatten nog voldoende nutriënten voor schimmelgroei en om een goede productie van deze enzymen te waarborgen. Daarnaast is er in de residuen ook nog voldoende lignine aanwezig voor inductie van de enzymen.

Tenslotte kan worden opgemerkt dat ook oxaalzuur, dat een belangrijke rol speelt bij de afbraak van lignine (zie paragraaf 2.3.), in hoge mate in residue aanwezig is.

A. bisporus en *P. ostreatus* worden bij commerciële productie met groot succes geteeld in een 'solid-state' proces. Samen met bovengenoemde redenen verdient het daarom zeer de aanbeveling om de potentie van (residuen van) de schimmels voor het verwijderen van xenobiotica uit verontreinigde grond te onderzoeken. Hierbij is voor een optimaal contact tussen schimmel en xenobiotica een goede menging van verontreinigde grond en residue van belang.

Ter ondersteuning cq. optimalisatie van grootschalige proeven kunnen afzonderlijke parameters (zie beneden) in laboratoriumexperimenten worden bestudeerd. Een aantal aandachtspunten die bij het onderzoek aan de orde zouden moeten komen zijn de volgende:

1. Optimale mengverhouding van grond en schimmelresidue

Er spelen hierbij een aantal belangen. Verwacht wordt dat wanneer het percentage schimmelresidue verhoogd wordt dit de snelheid van xenobioticumdegradatie gunstig zal beïnvloeden. Daartegenover bestaat natuurlijk de economische wens om met zo min mogelijk entmateriaal een optimaal resultaat van afbraak te behalen. Een en ander hangt mede samen met de aard van de geproduceerde (en eventueel opgehoopte) intermediairen, zoals de oplosbaarheid in (grond)water of vluchtigheid.

2. Beluchtingswijze (zuurstofvoorziening) en bodemvochtgehalte

Het bodemvochtgehalte is een belangrijke factor bij de biologische afbraak en nauw verwant met een andere factor die de biologische afbraak beïnvloedt, namelijk het zuurstofgehalte in de bodem. De poriën in de bodem, die niet met water zijn gevuld, bevatten lucht. Onder invloed van de zwaartekracht zakt water naar diepere bodemlagen en verdringt daar lucht uit de poriën. Omdat bovendien water minder zuurstof kan bevatten dan lucht, zijn diepere bodemlagen minder zuurstofrijk [83]. Beluchting is nodig voor zowel de groei van de

schimmels als voor de activiteit van de ligninolytische enzymen welke door de organismen worden geproduceerd. Om uitdroging van het afbraaksysteem te minimaliseren kan belucht worden met waterverzadigde lucht. Afhankelijk van de zuurstofconsumptie gedurende het afbraakproces kan continu of met onderbrekingen worden belucht.

3. pH en temperatuur

De optimale groei van *A. bisporus* en *P. ostreatus* vindt plaats bij pH 6-7 [12] respectievelijk pH 5-6 [72]. Onder deze condities worden tevens de ligninolytische enzymen geproduceerd. Dit zou als uitgangspunt gekozen moeten worden bij onderzoek naar xenobioticum afbraak door de schimmels. De organismen zijn in staat om bij temperaturen van 15-25°C te groeien.

4. Biologische beschikbaarheid van xenobiotica

Xenobiotica (en hun intermediären) kunnen, net als natuurlijke fenolische verbindingen, afhankelijk van de bodemsamenstelling (organische stofgehalte) en bodem-pH in aanzienlijke mate adsorberen aan bodemdeeltjes (zie ook paragraaf 3.2.3.). Dit vormt bij gebruik van schimmels voor bodemreiniging in principe geen probleem (radicaal-mechanismen, extracellulair). Het betekent echter wel dat het reinigingsproces langer duurt: de hybride xenobiotica-humus polymeren zijn relatief stabiel.

6. Literatuur

1. Abramowicz D (1990) Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Bio/Technol* 10:241-251
2. Arora DS, Sandhu DK (1987) Decomposition of angiospermic wood sawdust and laccase production by two *Pleurotus* species. *J Basic Microbiol* 27:179-184
3. Asada Y, Miyabe M, Kikkawa M, Kuwahara M (1986) Oxidation of NADH by a peroxidase of a lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*, and its involvement in the degradation of a lignin model compound. *Agric Biol Chem* 50:525-529
4. Aust SD (1990) Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microb Ecol* 20:197-209
5. Baars JJP (1996) Nitrogen metabolism in the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Proefschrift Katholieke Universiteit Nijmegen.
6. Badkoubi A, Stevens DK, Murarka IP (1996) Quantification of pentachlorophenol transformation product distribution in the presence of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Environ Cont Toxicol* 30:1-8
7. Banci L, Bertini I, Pease EA, Tien M, Turano P (1992) H-1 NMR investigation of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - A comparison with other peroxidases. *Biochemistry* 31:10009-10017
8. Barr DP, Aust SD (1994) Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol* 28:78A-87A
9. Barr DP, Aust SD (1994) Conversion of lignin peroxidase compound III to active enzyme by cation radicals. *Arch Biochem Biophys* 312:511-515
10. Bollag JM, Liu SY (1985) Formation of hybrid-oligomers between anthropogenic chemicals and humic acid derivatives. *Org Geochem* 1:131
11. Bonnarne P, Jeffries TW (1990) Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white-rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 56:210-217
12. Bonnen AM, Anton LH, Orth AB (1994) Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol* 60:960-965
13. Boominathan K, Reddy CA (1992) Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. In: Arora DK, Elander RP, Mukerji KG (eds) *Handbook of Applied Mycology*, vol 4 (Fungal Biotechnology). Marcel Dekker, Inc, NY, pp 763-822

14. Brown JA, Glenn JK, Gold MH (1990) Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bact* 172:3125-3130
15. Brodkorb TS, Legge RL (1992) Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58:3117-3121
16. Bumpus JA (1989) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 55:154-158
17. Bumpus JA, Aust SD (1985) Studies on the biodegradation of organopollutants by a white rot fungus. In: *Proceedings of the International Conference for New frontiers for Hazardous Waste Management*. EPA/6009-85/025. US Protection Agency, Washington, DC, pp 404-410
18. Bumpus JA, Aust SD (1987) Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 53:2001-2008
19. Bumpus JA, Powers RH, Sun T (1993) Biodegradation of DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Mycol Res* 97:95-98
20. Bumpus JA, Tien M, Wright DS, Aust SD (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228:1434-1436
21. Bumpus JA, Tien M, Wright DS, Aust SD (1985) Biodegradation of environmental pollutants by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Proceedings of the USEPA Eleventh Annual research Symposium on Toxic waste Disposal*. Cincinnati, EPA/6009-85/028. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, pp 120-126
22. Buswell JA (1992) Fungal degradation of lignin. In: Arora DK, Rai B, Mukerji KG, Knudsen GR (eds) *Handbook of Applied Mycology*, vol 1 (Soil and Plant). Marcel Dekker, Inc, NY, pp 425-480
23. Buswell JA (1994) Potential of spent mushroom substrate for bioremediation purposes. *Compost Sci Util* 2:31-36
24. Buswell JA, Odier E (1987) Lignin biodegradation. *CRC Crit REV Biotechnol* 6:1-60
25. Cai D, Tien M (1992) Kinetic studies on the formation and decomposition of compounds II and III. Reactions of lignin peroxidase with H₂O₂. *J Biol Chem* 267:11149-11155
26. Choi J, Aomine S (1974) Adsorption of pentachlorophenols by soils. *Soil Sci Plant Nutr* 20:135-144
27. Chung N, Aust SD (1995) Degradation of pentachlorophenol in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Hazard Mater* 41:177-183
28. Chung N, Aust SD (1995) Veratryl alcohol-mediated indirect oxidation of pentachlorophenol by lignin peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 322:143-148
29. Crosby DG (1981) Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl Chem* 53:1051-1080
30. Cserjesi AJ, Johnson EL (1972) Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. *Can J Microbiol* 18:45-49
31. Dec J, Bollag JM (1988) Microbial release and degradation of catechol and chlorophenols bound to synthetic humic acid. *Soil Sci Soc Am J* 52:1366-1371
32. Desrumaux B (1994) Champignonsteelt in Europa - voorjaar 1994. *De Champignoncultuur* 38:307-309
33. Dietrich DM, Hickey WJ, Lamar RT (1995) Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 61:3904-3909
34. Durrant AJ, Wood DA, Cain RB (1991) Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid state substrate fermentation. *J Gen Microbiol* 137:751-755
35. Eaton D (1985) Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. *Enzyme Microb Technol* 7:194-196
36. Eggert C, Temp U, Dean JFD, Eriksson KEL (1996) A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett* 391:144-148
37. Eggert C, Temp U, Eriksson KEL (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62:1151-1158
38. Eriksson KEL, Blanchette RA, Ander P (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. *Springer series in wood science*, Springer Verlag, Berlin, 407 pp

39. Fernando T, Aust SD (1994) Biodegradation of toxic chemicals by white-rot fungi. In: Chaudry GR (ed) Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals. Dioscorides Press, Portland, OR, pp 386-402
40. Fernando T, Aust SD, Bumpus JA (1989) Effects of culture parameters on DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Chemosphere 19:1387-1398
41. Field JA, de Jong E, Costa GF, de Bont JAM (1992) Biodegradation of aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Appl Environ Microbiol 58:2219-2226
42. Focht DD (1993) Microbial degradation of chlorinated biphenyls. In: Bollag JM, Stotzky G (eds) Soil Biochemistry, vol 8. Marcel Dekker, Inc, NY, pp 341-388
43. Garzillo AMV, Di Paolo S, Burla G, Buonocore V (1992) Differently-induced extracellular phenol oxidases from *Pleurotus ostreatus*. Phytochem 31:3685-3690
44. Gilbert FI, Minn CE, Duncan RC, Wilkinson J (1990) Effects of pentachlorophenol and other chemical preservatives on the health of wood-treating workers in Hawaii. Arch Environ Cont Toxicol 19:603-609
45. Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH (1983) An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem Biophys Res Commun 114:1077-1083
46. Haemmerli SD, Leisola MSA, Sanglard D, Fiechter A (1986) Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. J Biol Chem 261:6900-6903
47. Haider KM, Martin JP (1989) Mineralization of ¹⁴C-labelled humic acids and of humic-acid bound ¹⁴C xenobiotics by *Phanerochaete chrysosporium*. Soil Biol Biochem 20:425-429
48. Hammel KE, Kalyanaraman B, Kirk TK (1986) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J Biol Chem 261:16948-16952
49. Hatakka AI, Uusi-Rauva AK (1983) Degradation of ¹⁴C-labeled poplar wood lignin by selected white-rot fungi. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 17:235-242
50. Higuchi T (1989) Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidases and laccase of white-rot fungi. In: Lewis NG, Paice MG (eds) Plant Cell Wall Polymers. Biogenesis and biodegradation. ACS Symp Ser 399, ACS, Washington, DC, pp 482-502
51. Van Horen LGJ (1994) Landbouwtelling 1993, Cijfers over de champignoncultuur. De Champignoncultuur 38:35
52. de Jong E, Field JA, de Bont JAM (1994) Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol Rev 13:153-188
53. Kaal EEJ, Field JA, Joyce TW (1995) Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. Biores Technol 53:133-139
54. Kaal EEJ, de Jong E, Field JA (1993) Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Appl Environ Microbiol 59:4031-4036.
55. Kawai S, Umezawa, T, Shimada, M, Higuchi T (1988) Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. FEBS Lett 267:99-102
56. Kennedy DW, Aust SD, Bumpus JA (1990) Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767) Appl Environ Microbiol 56:2347-2353
57. Kim KJ, Shin KS, Hong SW (1986) Induction of extracellular polyphenol oxidase from two white-rot fungi. Kor J Mycol 1:43-47
58. Kimura Y, Asada Y, Kuwahara M (1990) Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. Appl Microbiol Biotechnol 32:436-442
59. Kirk TK, Farrell RL (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Annu Rev Microbiol 41:465-505
60. Kirk TK, Schultz E, Connors, WJ, Lorenz LF, Zeikus JG (1978) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch Microbiol 117:277-285
61. Kohler A, Jager A, Willershausen H, Graf H (1988) Extracellular ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall has no role in the degradation of DDT. Appl Microbiol Biotechnol 29:618-620
62. Kuo WS, Regan RW Sr (1992) Degradation of carbaryl and 1-naphthol by spent mushroom compost microorganisms. Wat Sci Technol 26:2081-2084
63. Laine MM, Jørgensen KS (1996) Straw compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of

chlorophenol-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 62:1507-1513

64. Lal R, Saxena DM (1982) Accumulation, metabolism and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiol Rev* 46:95-127
65. Lamar RT, Dietrich DM (1990) In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56:3093-3100
66. Lamar RT, Dietrich DM (1992) Use of lignin degrading fungi in the disposal of pentachlorophenol-treated wood. *J Ind Microbiol* 9:181-
67. Lamar RT, Glaser JA, Kirk TK (1990) Fate of pentachlorophenol (PCP) in sterile soils inoculated with *Phanerochaete chrysosporium*: mineralisation, volatilization and depletion of PCP. *Soil Biol Biochem* 22:433-440
68. Liang R, McFarland MJ (1994) Biodegradation of pentachlorophenol in soil amended with the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Hazard Waste Hazard Mater* 11:411-421
69. Lin Je, Wang HY, Hickey RF (1990) Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Bioeng* 35:1125-1134
70. Linko S (1992) Production of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase. *Biotechnol Adv* 10:191-236
71. Loske D, Hüttermann A, Majcherczyk A, Zadrazil F, Lorsche H, Waldinger P (1990) Use of white-rot fungi for the clean-up of contaminated sites. In: Coughlan MP, Amaral Collaco MT (eds) *Advances in biological treatment of lignocellulosic materials*, pp 311-321
72. Manu-Tawiah W, Martin AM (1988) Nitrogen sources and the growth response of *Pleurotus ostreatus* mushroom mycelium. *Can Inst Food Sci Technol J* 21:194-199
73. Mayer AM (1986) Polyphenol oxidases in plants - recent progress. *Phytochemistry* 26:11-20
74. Mester T, de Jong E, Field JA (1995) Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. *Appl Environ Microbiol* 61:1881-1887
75. Metcalf RL (1973) A century of DDT. *J Agric Food Chem* 21:511-519
76. Mileski GJ, Bumpus JA, Jurek MA, Aust SD (1988) Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 54:2885-2889
77. Murthy NBK, Kaufman DD, Fries F (1979) Degradation of pentachlorophenol (PCP) in aerobic and anaerobic soil. *J Environ Sci Health B* 14:1-14
78. Okeke BC, Smith JE, Paterson A, Watson-Craik IA (1996) Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:263-266
79. Paszczyński A, Crawford RL (1995) Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Prog* 11:368-379
80. Regan RW Sr (1994) Use of SMS as a compost matrix to degrade pesticide residuals. *Compost Sci Util* 2:56-62
81. Reinhammer B (1984) Laccase. In: Lontie R (ed) *Copper proteins and copper enzymes*. CRC Press, Boca Raton, pp 1-35
82. Šašek V, Volvofá O, Erbanová P, Vyas BRM, Matucha M (1993) Degradation of PCBs by white rot fungi, methylotrophic and hydrocarbon utilizing yeasts and bacteria. *Biotechnol Lett* 15:521-526
83. Schachtschabel P, Blume HP, Hartge KH, Schwertmann U (1984) *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp 18-23, 151-190
84. Smith JF, Claydon N, Love ME, Allan M, Wood DA (1989) Effect of substrate depth on extracellular endocellulase and laccase production of *Agaricus bisporus*. *Mycol Res* 93:292-296
85. Stark LR, Williams FM (1994) The roles of spent mushroom substrate for the mitigation of coal mine drainage. *Compost Sci Util* 2:84-94
86. Thomas DR, Carswell KS, Georgiou G (1992) Mineralization of biphenyl and PCBs by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Bioeng* 40:1395-1402
87. Tien M, Kirk TK (1983) Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221:661-663

88. Tien M, Kirk TK (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc Natl Acad Sci USA 81:2280-2284
89. Turner EM (1974) Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. Trans Br Mycol Soc 63:541-547
90. Valli K, Brock BJ, Joshi D, Gold MH (1992) Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol 58:221-228
91. Valli K, Wariishi H, Gold MH (1992) Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J Bact 174:2131-2137
92. Vyas BRM, Šašek V, Matucha M, Bubner M (1994) Degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by selected white rot fungi. Chemosphere 28:1127-1134
93. Waksman S, Nissen W (1932) On the nutrition of the cultivated mushroom *Agaricus campestris*, and the chemical changes brought about by this organism in the manure compost. Am J Bot 19:514-537
94. Wariishi H, Akileswaran L, Gold MH (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral characterization of the oxidation states and the catalytic cycles. Biochemistry 27:5365-5370
95. Wariishi H, Dunford HB, MacDonald D, Gold MH (1989) Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J Biol Chem 264:3335-3340
96. Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* - Kinetic mechanism and role of chelators. J Biol Chem 267:23688-23695
97. Wood DA (1980) Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. J Gen Microbiol 117:327-338
98. Wood DA (1980) Inactivation of extracellular laccase of *Agaricus bisporus* during fruiting. J Gen Microbiol 117:339-345
99. Wood DA, Goodenough PW (1977) Fruiting of *Agaricus bisporus*. Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. Arch Microbiol 114:161-165
100. Youn HD, Hah YC, Kang SA (1995) Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. FEMS Microbiol Lett 132:183-188
101. Zeddel A, Majcherczyk A, Huttermann A (1993) Degradation of polychlorinated biphenyls by the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in a solid state system. Toxicol Environ Chem 40:255-266

