

NOBIS 95-1-09
ON SITE PRODUCTIE VAN BIOSURFACTANTS BIJ IN
SITU BIOLOGISCHE BODEMREINIGING

Fase 2: Effect van biosurfactants op de mobilisatie
van olie

dr.ir. F. Volkering (MTI Milieutechnologisch Instituut)
drs. W.H. Noordman (Vakgroep Biochemie, Rijksuniversiteit Groningen)

mei 1997

Gouda, CUR/NOBIS

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. "©"On site productie van biosurfactants bij in situ biologische bodemreiniging - Fase 2: Effect van biosurfactants op de mobilisatie van olie", mei 1997, 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, unless the source of the quotation, and, insofar as this has been published, the name of the author, are clearly mentioned. "©"On site production of biosurfactants for in situ bioremediation - Phase 2: Effect of biosurfactants on the mobilization of oil", May 1997, CUR/NOBIS, Gouda, The Netherlands."

Liability

CUR/NOBIS and all contributors to this publication have taken every possible care by the preparation of this publication. However, it can not be guaranteed that this 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 insofar as this damage is a result of intentional fault or gross negligence of CUR/NOBIS and/or the contributors.

Titel rapport

On site productie van biosurfactants
bij in situ biologische bodemreiniging
Fase 2: Effect van biosurfactants op de
mobilisatie van olie

CUR/NOBIS rapportnummer

95-1-09

Project rapportnummer

95-1-09 fase 2

Auteur(s)

dr.ir. F. Volkering
drs. W.H. Noordman

Aantal bladzijden

Rapport: 32

Bijlagen: 6

Uitvoerende organisatie(s) (Consortium)

MTI Milieutechnologisch Instituut C.V., Nijmegen (dr.ir. F. Volkering, 024-3601212)
HASKONING Ingenieurs- en Architectenbureau B.V., Nijmegen (dr.ir. M. Hinsenveld, 024-3284284)
Van der Sluijs Tankopslag B.V., Geertruidenberg (drs. P. Peters, 0162-586000)
Vakgroep Biochemie, Rijksuniversiteit Groningen (prof.dr. D.B. Janssen, 050-3634209)

Uitgever

CUR/NOBIS, Gouda

Samenvatting

Dit rapport beschrijft de tweede fase van een project met als doel het ontwikkelen en testen van een in situ bodemreinigingssysteem, waarbij biosurfactants worden geproduceerd tijdens de biologische reiniging van opgepompt verontreinigd grondwater. Het effluent met geproduceerde biosurfactants wordt in de bodem geïnjecteerd om de als een drijfslaag in de bodem aanwezige minerale olie te mobiliseren. In de eerste fase van het project is het reeds mogelijk gebleken biosurfactants te produceren bij de afbraak van minerale olie onder omstandigheden die in de praktijk eenvoudig kunnen worden gerealiseerd. In de tweede fase van het project is het effect van de biosurfactants op de mobilisatie van olie onderzocht. Hiervoor zijn kolomexperiment met twee systemen uitgevoerd: (i) een modelsysteem met hexadecaan en een matrix van silica en (ii) grond van de verontreinigde site. Uit de resultaten met het modelsysteem is gebleken dat bij doorspoeling van de kolommen met gezuiverde biosurfactantoplossingen tot 9 maal zoveel hexadecaan wordt uitgespoeld als bij doorspoeling met water. In de experimenten met verontreinigde grond is bij doorspoeling met water een verwijdering van minder dan 0,1 % van de aanwezige olie gevonden. Bij het gebruik van biosurfactants is, afhankelijk van de biosurfactantoplossing en het initiële oliegehalte, een uitspoeling van 3 - 24 % van de aanwezige olie waargenomen. Er is geconcludeerd dat de olie in de grond slecht beschikbaar is, maar dat deze beschikbaarheid kan worden verhoogd door de toepassing van de geproduceerde biosurfactants.

Trefwoorden**Gecontroleerde termen:**

biobeschikbaarheid, biologische afbraak,
in situ bodemsanering

Vrije trefwoorden:

biodegradatie, biosurfactants, kolom-
studies, minerale olie, rhamnolipiden

Titel project

On site productie van biosurfactants
bij in situ biologische bodemreiniging

Projectleiding

MTI Milieutechnologisch Instituut
(dr.ir. F. Volkering, 024-3601212)

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

Report title

On site production of biosurfactants for
in situ bioremediation
Phase 2: Effect of biosurfactants on the
mobilization of oil

CUR/NOBIS report number

95-1-09

Project report number

95-1-09 phase 2

Author(s)

dr.ir. F. Volkering
drs. W.H. Noordman

Number of pages

Report: 32
Appendices: 6

Executive organisation(s) (Consortium)

MTI Milieutechnologisch Instituut C.V., Nijmegen (dr.ir. F. Volkering, 024-3601212)
HASKONING Ingenieurs- en Architectenbureau B.V., Nijmegen (dr.ir. M. Hinsenveld, 024-3284284)
Van der Sluijs Tankopslag B.V., Geertruidenberg (drs. P. Peters, 0162-586000)
Vakgroep Biochemie, Rijksuniversiteit Groningen (prof.dr. D.B. Janssen, 050-3634209)

Publisher

CUR/NOBIS, Gouda

Abstract

This report describes the second phase of a project, the aim of which is to develop and test a in situ soil remediation system in which biosurfactants are being produced during the on site biological treatment of oil-polluted groundwater. The treated effluent, containing the biosurfactants, is to be reinjected into the soil to increase the bioavailability of the oil present as a NAPL. In the first phase of the project it was shown that biosurfactants are being produced during the biodegradation of mineral oil under circumstances that can easily be created at full scale. In the second phase the effect of the biosurfactants on the mobilization of oil is addressed. For this, column studies in two systems have been performed: (i) a model system with hexadecane and matrix of silica, and (ii) oil-containing soil from the polluted site. In both systems the biosurfactants were found to have a positive effect on the leaching of oil from the columns. In the model system addition of 100 mg/L of purified biosurfactants to the influent resulted in a 9-fold increase of hexadecane in the effluent. In the experiments with polluted soil less than 0.1 % of the oil initially present was removed by leaching the column with water. Using biosurfactant solutions 3 - 24 % was removed, depending on the biosurfactant solution used. It was concluded that the oil in the polluted soil is poorly available and can be mobilized using the biosurfactants produced.

Keywords**Controlled terms:**

bioavailability, biodegradation,
in situ bioremediation

Uncontrolled terms:

bioemulsifier, biosurfactants, column
studies, mineral oil, rhamnolipids

Project title

On site production of biosurfactants for
in situ bioremediation

Projectmanagement

MTI Milieutechnologisch Instituut
(dr.ir. F. Volkering, 024-3601212)

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

VOORWOORD

Het overgrote deel van de biologische in situ bodemreinigingen in Nederland wordt uitgevoerd bij verontreinigingen met minerale olie. Minerale olie is onder aërobe omstandigheden goed biologisch afbreekbaar en het is gebleken dat het toevoegen van zuurstof aan de bodem een goede manier is om deze biologische afbraak te stimuleren. Eén van de struikelblokken hierbij is de aanwezigheid van pure verontreiniging, die vaak als in de zone rond de grondwaterspiegel voorkomt. De biologische afbraak hiervan wordt gelimiteerd door de geringe biobeschikbaarheid van de verontreiniging. Om een mogelijke oplossing voor dit probleem te onderzoeken is in 1995 een consortium gevormd, bestaande uit MTI Milieutechnologie C.V., HASKONING Ingenieurs- en Architectenbureau B.V., de Vakgroep Biochemie van de Rijksuniversiteit Groningen en Van der Sluijs Tankopslag B.V. In december 1995 is door dit consortium begonnen met de uitvoering van het door de Stichting NOBIS gesubsidieerde project: "On site productie van biosurfactants bij biologische in-situ bodemreiniging". De eerste fase van het project, waarin de optimalisatie van de biosurfactant-productie is onderzocht, is succesvol afgerond in oktober 1996. Voor u ligt het eindrapport van de tweede fase van het project waarin het effect van de biosurfactants op de mobilisatie van olie wordt beschreven.

mei 1997

INHOUD

		SAMENVATTING	v
		SUMMARY	vi
Hoofdstuk	1	INLEIDING	1
	1.1	Probleemdefinitie	1
	1.2	Toepassing van biosurfactants	1
	1.3	Doelstelling en opzet	2
Hoofdstuk	2	PRODUCTIE VAN BIOSURFACTANTS VOLGENS DE GEOPTIMALISEERDE METHODE	3
	2.1	Inleiding	3
	2.2	Materialen en methoden	3
	2.3	Resultaten en discussie	3
Hoofdstuk	3	BEPALING VAN HET EFFECT VAN BIOSURFACTANTS OP DE VERWIJDERING VAN HEXADECAN IN EEN MODELSYSTEEM	7
	3.1	Inleiding	7
	3.2	Materialen en methoden	7
	3.3	Resultaten en discussie	8
	3.4	Conclusies	15
Hoofdstuk	4	BEPALING VAN HET EFFECT VAN BIOSURFACTANTS OP DE VERWIJDERING VAN MINERALE OLIE UIT VERONTREINIGDE GROND	17
	4.1	Inleiding	17
	4.2	Materialen en methoden	17
	4.3	Resultaten en discussie	19
	4.3.1	Eerste serie uitloogexperimenten	19
	4.3.2	Tweede serie uitloogexperimenten	22
	4.3.3	Drukval over kolommen	25
Hoofdstuk	5	ALGEMENE DISCUSSIE EN CONCLUSIES	27
		LITERATUUR	31
Bijlage	A	GC-CHROMATOGRAMMEN ZONNEBLOEMOLIE, REACTORVLOEISTOF B EN MINERALE OLIE	
Bijlage	B	VERLOOP VAN DE DRUK BIJ DOORSPOELING MET VERSCHILLENDE VLOEISTOFFEN	
Bijlage	C	THEORETISCH ONTWERP VAN TOEPASSING VAN HET VOORGESTELDE SYSTEEM	

SAMENVATTING

On site productie van biosurfactants bij in situ biologische bodemreiniging

De biologische in situ reiniging van hydrofobe organische verontreinigingen wordt veelal gelimiteerd door de biobeschikbaarheid van de verontreiniging. Een methode om dit probleem op te lossen is het gebruik van surfactants. Bij de groei op slecht oplosbare substraten produceren micro-organismen vaak verbindingen die de biobeschikbaarheid van het substraat verhogen. Deze verbindingen worden biosurfactants genoemd. Het doel van dit project is het verhogen van de biobeschikbaarheid van de verontreiniging door het stimuleren van de productie van biosurfactants tijdens de bovengrondse reiniging van met minerale olie verontreinigd grondwater. Het gereinigde grondwater met de biosurfactants wordt dan weer in de bodem geïnjecteerd om de mobilisatie en biodegradatie van de olie in de bodem te bevorderen. In de eerste fase van het project, waarvan de resultaten elders zijn gepubliceerd, is het reeds mogelijk gebleken biosurfactants te produceren bij de afbraak van minerale olie onder omstandigheden die in de praktijk eenvoudig kunnen worden gerealiseerd.

Dit rapport beschrijft de resultaten van de tweede fase van het project, waarin op laboratoriumschaal het effect van de biosurfactants op de mobilisatie van olie is onderzocht. Hiervoor zijn twee systemen gebruikt:

- (i) een modelsysteem met aan een synthetische matrix (silica) gebonden hexadecaan;
- (ii) grond van de verontreinigde site.

Uit de resultaten met het modelsysteem blijkt dat het biosurfactant in gezuiverde vorm een verhoging van de mobiliteit van hexadecaan veroorzaakt: na doorspoeling van de kolom met 20 porievolumes wordt 9 maal zoveel hexadecaan uitgespoeld als bij doorspoeling met water. De resultaten zijn echter minder goed dan die behaald zijn met rhamnolipide biosurfactants: hiermee is het mogelijk tot 90 maal zoveel hexadecaan te verwijderen dan bij doorspoeling met water.

Het effect van ongezuiverde biosurfactantoplossingen op de verwijdering van minerale olie uit verontreinigde grond in kolomexperimenten is minder duidelijk. Op basis van de concentraties minerale olie, gemeten in de effluënten van de kolommen, wordt bij de biosurfactants een sterke verhoging van de uitspoeling van olie waargenomen. In de experimenten waarbij water wordt gebruikt, heeft vrijwel geen verwijdering van olie plaats ($< 0,1$ % van de aanwezige olie). Bij het gebruik van biosurfactants is, afhankelijk van de biosurfactantoplossing en het initiële oliegehalte, via metingen in het effluent een verwijdering van 3 - 24 % van de aanwezige olie waargenomen. Wanneer echter het oliegehalte in de grond voor en na het experiment als criterium wordt gebruikt, is er slechts een gering effect van de biosurfactants gevonden. De belangrijkste reden hiervoor lijkt de onnauwkeurigheid in de bepaling van de oliegehalten in verhouding tot het percentage olie dat is verwijderd, zodat kan worden gesteld dat de olieconcentratie in de effluënten het beste criterium is om de mobilisatie van de olie te beoordelen. Op basis hiervan is geconcludeerd dat het gebruik van biosurfactants een duidelijke mobilisatie van de olie veroorzaakt.

SUMMARY

On site production of biosurfactants for in situ bioremediation

Surfactants can be used to overcome the problem of limited bioavailability of hydrophobic organic pollutants in biological soil remediation, especially for pollutants present as a nonaqueous phase liquid (NAPL). It is well known that during growth on poorly soluble substrates microorganisms can produce compounds, called biosurfactants, which enhance the uptake of these substrates. The aim of the project is to optimize the production of biosurfactants by mixed cultures during the on site biological treatment of oil-polluted groundwater. The treated effluent, containing the biosurfactants, is to be reinjected into the soil to promote the mobilization and biodegradation of the oil present as a NAPL. In the first phase of the project, the results of which have been published previously, it was shown that biosurfactants are being produced during the biodegradation of mineral oil under circumstances that can easily be created at full scale.

This report presents the results of the second phase of the project, in which the effect of the biosurfactants on the mobilization of oil is addressed. For this, two systems have been used:

- (i) a model system with hexadecane and matrix of silica;
- (ii) oil-containing soil from the polluted site.

The use of purified biosurfactants in the model system increased the leaching of hexadecane from the silica matrix with a factor 9 after flushing 20 porevolumes. However, the results obtained with rhamnolipid biosurfactants were even better as leaching with rhamnolipid-solutions released 90 times more hexadecane than leaching with water.

The results of the experiments with polluted soil are less equivocal. Based upon the oil concentrations in the effluents of soil columns, the mobilization of the mineral oil was increased markedly when the biosurfactants were applied. In the experiments without biosurfactants, less than 0.1 % of the initially present oil was leached. Using biosurfactants, 3 - 24 % of the initial oil was found in the leachate, depending on the biosurfactant solution used and on the initial oil content of the soil. However, when the oil content of the soil before and after the experiment are regarded, only a small effect of the biosurfactants can be observed. The most likely explanation for this difference is the inaccuracy of the determination of mineral oil in soil compared to the amount of oil that was removed. Therefore the oil concentration in the leachates was considered to be the most reliable parameter for assessing the oil mobilization and it is concluded that application of the biosurfactants caused a significant mobilization of oil.

INLEIDING

1.1 Probleemdefinitie

Eén van de problemen bij biologische in situ bodemreiniging is de lage afbraaksnelheid van hydrofobe organische verontreinigingen, zoals PAK's, PCB's en minerale olie. Hierdoor wordt de duur van de sanering te lang en worden de gewenste eindconcentraties niet gehaald. De voornaamste reden hiervoor is dat deze verbindingen slecht in water oplosbaar zijn en daardoor sterk aan de bodemmatrix hechten of voorkomen in een aparte fase. Als gevolg hiervan zijn deze verbindingen niet direct beschikbaar voor de afbrekende micro-organismen en de afbraaksnelheid wordt gelimiteerd door het transport van de verontreiniging naar de waterige fase [Mihelcic et.al, 1993]. Door de hydrofobiciteit van de verontreinigingen kan dit transport zeer traag verlopen. Dit probleem wordt ook wel limitatie van biobeschikbaarheid genoemd en wordt algemeen als één van de belangrijke biologisch-technologische knelpunten bij de biologische in situ bodemreiniging beschouwd.

1.2 Toepassing van biosurfactants

De meest genoemde oplossing voor biobeschikbaarheidsproblemen is het gebruik van oppervlakte-actieve stoffen (surfactants of tensiden). Surfactants zijn moleculen met een hydrofiel en een hydrofoob gedeelte, waardoor surfactantmoleculen de eigenschap hebben zich sterk te concentreren aan grensvlakken en oppervlakken. In een verontreinigde bodem kunnen surfactants de processen die plaatshebben op de grensvlakken tussen de waterfase, de bodemmatrix en de verontreiniging beïnvloeden. Surfactants zijn via een aantal verschillende mechanismen in staat de biobeschikbaarheid van slecht oplosbare organische verontreinigingen in de bodem te vergroten [Volkering, 1996]:

- (i) solubilisatie in micellen, aggregaten van surfactantmoleculen;
- (ii) emulgering van vloeibare verontreinigingen;
- (iii) mobilisatie van verontreinigingen in de poriën van bodemdeeltjes door verlaging van de oppervlaktetensie (betere bevochtiging).

Wanneer, zoals in het geval van drijfvlagen van minerale olie, de verontreiniging aanwezig is als aparte vloeistoffase (Engelse term: nonaqueous phase liquid of NAPL) zullen de mechanismen (ii) en (iii) het belangrijkste zijn.

Bij de microbiële afbraak van slecht in water oplosbare organische verontreinigingen produceren de afbrekende micro-organismen vaak verbindingen die de beschikbaarheid van de verontreiniging verhogen [b.v. Hommel, 1990]. Dit verschijnsel kan ook bij de degradatie van olie in de bodem optreden [Francy et al., 1991]. Een algemene term voor deze verbindingen is biosurfactants, hoewel niet alle biosurfactants ook werkelijk sterke oppervlakte-actieve eigenschappen hebben. Globaal kan er onderscheid worden gemaakt tussen twee verschillende typen biosurfactants. De biosurfactants van het eerste type zijn in staat zeer lage oppervlaktetensies te veroorzaken en vormen bij hogere concentraties micellen. De effecten van deze verbindingen op de biobeschikbaarheid worden dan ook voornamelijk veroorzaakt door de mechanismen (i) en (iii). Voorbeelden van deze verbindingen zijn verschillende soorten glycolipiden (rhamnolipiden) en lipopeptiden.

De biosurfactants van het tweede type hebben alle sterke emulgerende eigenschappen en worden daarom ook wel bio-emulsifiers genoemd. Bio-emulsifiers hebben over het algemeen minder sterke oppervlakte-actieve eigenschappen dan glycolipiden en lipopeptiden. De effecten van bio-emulsifiers op de biobeschikbaarheid worden dan ook voornamelijk veroorzaakt door mechanisme (ii). Voorbeelden van bio-emulsifiers zijn vetzuren, fosfolipiden, polypeptiden en polysacchariden.

In de eerste fase van het project [Volkering en Noordman, 1996] is reeds aangetoond dat het mogelijk is om de productie van biosurfactants tijdens de afbraak van minerale olie te stimuleren. Hierbij wordt onder niet-steriele omstandigheden gewerkt met een mengcultuur van micro-organismen die afkomstig is van grondwater van de verontreinigde site onder omstandigheden zoals die ook in de praktijk te realiseren zijn. De geproduceerde biosurfactants blijken voornamelijk uit polysacchariden te bestaan en hebben goede emulgerende eigenschappen, zodat ze als bio-emulsifiers zijn te beschouwen.

1.3 Doelstelling en opzet

In de tweede fase van het project, waarvan hier wordt gerapporteerd, is het effect van de biosurfactants op de (bio)beschikbaarheid van olie bestudeerd. Hiertoe is in het laboratorium het effect van de biosurfactants op de volgende processen onderzocht:

- verwijdering van hexadecaan uit een modelsysteem;
- verwijdering van minerale olie uit verontreinigde grond.

Het doel van deze fase van het project is het aantonen van een verbeterde verwijdering van olie door toepassing van de geproduceerde biosurfactants. Ter vergelijking worden ook experimenten met rhamnolipide biosurfactants (biosurfactants met sterke oppervlakte-actieve werking) uitgevoerd. In het verdere rapport wordt de term biosurfactants gebruikt voor de geproduceerde (polysaccharide) biosurfactants, wanneer rhamnolipiden worden gebruikt, wordt dit consequent vermeld.

Het onderzoek is verdeeld in drie deelfasen:

1. productie van biosurfactants volgens de geoptimaliseerde methode;
2. bepaling van het effect van biosurfactants (polysaccharide biosurfactants en rhamnolipide biosurfactants) op de verwijdering van hexadecaan in een modelsysteem (silica);
3. bepaling van het effect van biosurfactants op de verwijdering van minerale olie uit verontreinigde grond.

De uitvoering van de onderdelen 1 en 3 is gebeurd bij MTI Milieutechnologie te Nijmegen, onderdeel 2 is uitgevoerd bij de vakgroep Biochemie van de Rijksuniversiteit Groningen. Ook in dit rapport wordt de indeling in deelfasen aangehouden.

PRODUCTIE VAN BIOSURFACTANTS VOLGENS DE GEOPTIMALISEERDE METHODE

2.1 Inleiding

In de eerste fase van het project is een geoptimaliseerde methode ontwikkeld voor de productie van biosurfactants tijdens de afbraak van minerale olie door een gemengde bacteriecultuur. Hierbij wordt aan een aërobe, goed gemengde reactor als koolstof- en energiebron volgens een fed batch-methode een mengsel van minerale olie en zonnebloemolie toegevoegd. Deze methode is tijdens fase 2 gebruikt om de biosurfactantmengsels te produceren die nodig zijn voor de kolom- en biodegradatie-experimenten. Hiertoe zijn twee reactoren met een werkvolume van 1 L en één reactor met een werkvolume van 10 L gebruikt.

2.2 Materialen en methoden

Voor een gedetailleerde beschrijving van de methode van de productie van biosurfactants wordt verwezen naar [Volkering en Noordman, 1996]. Kort samengevat worden de biosurfactants geproduceerd in een aërobe, goed gemengde reactor met een gebufferd mineraal medium pH = 7, waarin een gemengde microbiële populatie op dragermateriaal (polyurethaan schuim) aanwezig is. Deze populatie is opgehoopt met minerale olie als koolstofbron uit het grondwater van de site. Als koolstof- en energiebron wordt fed batchgewijs zonnebloemolie (reactor B) of een 2 : 1 mengsel van zonnebloemolie en minerale olie van de verontreinigde site (reactoren A en C) aan de reactor toegevoegd met een snelheid van circa 0,1 % (v/v) per dag. Na 4 - 6 dagen wordt de reactorvloeistof vervangen door nieuw mineraal medium; de zo verkregen reactorvloeistoffen worden gebruikt als basis voor de biosurfactantoplossingen bij de uitloogexperimenten.

Bij de aanvang van de experimenten zijn cultures, die gedurende enige maanden onder sub-optimale condities zijn aangehouden, als entmateriaal gebruikt. Bij het opstarten van reactor C is de mengcultuur uit reactor A gebruikt als entmateriaal.

De productie van biosurfactants is beoordeeld aan de hand van twee parameters:

1. de oppervlaktespanning, bepaald in het supernatant van de reactorvloeistof (verkregen door centrifugeren) met een Krüss-tensiometer;
2. de emulgerende activiteit (E_{24}); deze werd bepaald door gelijke delen van de reactorvloeistof en van olie van de verontreinigde site in een reageerbuis te brengen en deze gedurende 1 minuut krachtig te mengen. Geëmulgeerde olie vormt dan een aparte laag tussen de oliefase en de waterfase. De relatieve hoogte van deze laag, gemeten na 24 h, is een goede maat voor de emulgerende activiteit. Bij een E_{24} van 100 % is dus na 24 h de hele inhoud van de buis nog geëmulgeerd.

Daarnaast is periodiek ook de viscositeit en de olieconcentratie van de reactorvloeistoffen bepaald.

2.3 Resultaten en discussie

De resultaten van de emulgerende activiteit van de reactoren A en B zijn weergegeven in figuur 1. Na een opstartperiode van circa twee weken wordt in de reactoren een stabiele productie van biosurfactants waargenomen. Op dag 41 is bij reactor A door praktische problemen de olietoevoer gedurende circa 48 h uitgevallen.

Fig. 1. Emulgerende activiteit (E_{24}) in biosurfactantproductiereactoren met 1 : 1 zonnebloemolie en drijfslaagolie (A) en zonnebloemolie (B). Verticale lijnen geven het tijdstip aan waarop de reactorinhoud is vervangen.

Het blijkt dat dit een verstoring van de productie van biosurfactants tot gevolg heeft, die ook bij de volgende fed batch nog doorwerkt. Daarnaast is te zien dat in de reactor waaraan alleen zonnebloemolie is toegediend (B) betere emulgering wordt bereikt dan in de reactor waaraan een mengsel van zonnebloemolie en minerale olie wordt toegediend. Reactor C is gebruikt om met één productiebatch een grote hoeveelheid biosurfactantoplossing te maken. Nadat is geënt met 100 ml (= 1 % v/v) van reactorvloeistof A is een opstartperiode van circa drie weken nodig om tot goede emulgerende activiteit te komen. Vervolgens is nog eenmaal nieuw mineraal medium aan de reactor toegevoegd; de vloeistof uit deze batch is gebruikt voor de uitloogexperimenten.

De olieconcentraties in de reactorvloeistoffen, die voor de kolomexperimenten zijn gebruikt, variëren van 1 tot 90 mg/L. Voor dit grote verschil zijn twee verklaringen. De eerste verklaring is het moment waarop de vloeistof uit de reactor is genomen. Om de juiste hoeveelheid te kunnen toevoeren, wordt de olie discontinu gedoseerd, waarbij de pomp 15 minuten per 2 uur heeft aangestaan. Wanneer tijdens de dosering een monster wordt genomen, bevat dit relatief veel olie. De tweede verklaring heeft te maken met de zonnebloemolie die is gebruikt: bij de productie van biosurfactants voor de tweede serie kolomexperimenten is een nieuw merk zonnebloemolie gebruikt. In tegenstelling tot het eerder gebruikte merk wordt deze zonnebloemolie gedetecteerd bij de gebruikte methode om olie te bepalen en blijkt het evenals de minerale olie niet geheel te worden afgebroken in de reactoren, waarbij producten ontstaan die ook worden gedetecteerd. Chromatogrammen van de zonnebloemolie en van de reactorvloeistof B zijn gegeven in bijlage A. De zonnebloemolie bevat componenten met retentietijden die voornamelijk overeenkomen met minerale olie fracties C20-C24 en C32-C40. Vergelijking met de vloeistof uit reactor B laat zien dat de C20-C24 componenten grotendeels worden afgebroken, zodat de relatieve concentratie van de C32-C40 componenten ten opzichte van die van de andere componenten in de reactorvloeistof hoger is dan die in de zonnebloemolie. De totale olieconcentratie in vloeistof B is 84 mg/L, waarvan 74 mg/L in de fractie C32-C40.

Omdat het GC-chromatogram van reactorvloeistof B duidelijk afwijkt van dat van de minerale olie (zie fig. A3 in bijlage A) is het mogelijk om bij de uitloogexperimenten grotendeels voor het storende effect van de zonnebloemolie te kunnen corrigeren, maar bij toepassing in de praktijk moet een type zonnebloemolie worden gebruikt dat niet wordt gedetecteerd bij de bepaling van minerale olie.

De reactorvloeistof uit de 10-L reactor (C) is aanzienlijk visceuzer dan die uit de beide 1-L reactoren. Met de gebruikte methode is het niet goed mogelijk de viscositeit van vloeistof C direct te bepalen, maar na een 1 : 1 verdunning met water wordt een viscositeit van 18 mPa.s gemeten. De vloeistoffen uit de reactoren A en B hebben een gemiddelde viscositeit van circa 8 mPa.s. De oorzaak voor dit verschil is niet onderzocht.

BEPALING VAN HET EFFECT VAN BIOSURFACTANTS OP DE VERWIJDERING VAN HEXADECAN IN EEN MODELSYSTEEM

3.1 Inleiding

Biosurfactants kunnen het gedrag van verontreinigingen in de bodem op vele manieren beïnvloeden (zie hoofdstuk 1). Voor verwijdering van minerale olie vanuit de bodem wordt verwacht dat vooral het effect van biosurfactants op de emulgering van olie en de verlaging van de olie-watergrensvlakspanning van belang zijn. Beide processen zijn uitvoerig onderzocht in afwezigheid van een bodem [Syldatk et al., 1985; Pennell et al., 1993]. Het is minder bekend in hoeverre deze processen bijdragen aan het effect van biosurfactants op de mobilisatie van olie uit een grondkolom. Ook de invloed van biosurfactants op de kinetisch-gelimiteerde processen, die de trage verwijdering van olie bepalen, zijn onvoldoende onderzocht. Specifiek voor dit project is het van belang te weten hoe de performance van het in fase I geïsoleerde polysaccharide biosurfactant is.

Om inzicht te verkrijgen in het werkingsmechanisme van de geïsoleerde biosurfactants en om de bruikbaarheid van deze verbindingen voor de biologische reiniging van met non-aqueous phase liquids verontreinigde grond te bepalen, is in kolomexperimenten het effect van deze biosurfactants bepaald op de verwijdering van een modelolie (hexadecaan) uit een modelmatrix (silica). In deze experimenten is hexadecaan fijn verdeeld aanwezig in de poriën van silica als een organische fase. Dit lijkt op de manier waarop NAPL's in een bodem aanwezig zijn.

Met deze opzet kan onder goed gedefinieerde omstandigheden het effect van het biosurfactant op de verwijdering van olie-achtige verbindingen worden bepaald. De concentraties van hexadecaan en biosurfactant in het effluent van de kolom en de restconcentratie van hexadecaan die nog aanwezig was in de kolom na afloop van de experimenten zijn gemeten. Het effect van het debiet door de kolom op hexadecaanverwijdering is vastgesteld. Kinetisch-gelimiteerde processen zijn onderzocht met flow-interruptie experimenten. Er is gewerkt met gezuiverd biosurfactant. Het effect van dit biosurfactant is vergeleken met dat van rhamnolipide biosurfactants [Van-Dyke et al., 1993].

3.2 Materialen en methoden

Modelmatrix en oplossingen

Aan 100 g silica (Merck, deeltjesgrootte 43 - 60 : m, poriediameter 60 Å) is 200 mL hexaan toegevoegd en 0,77 g hexadecaan (5,35 mmol). Na een dag incubatie is de hexaan geleidelijk met een filmverdampert verwijderd. De met hexadecaan gecontamineerde silica bevat ongeveer 7700 mg hexadecaan per kg d.s. Dit betekent dat ongeveer 1 % van de poriën met hexadecaan is gevuld. Alle kolomexperimenten zijn uitgevoerd in een elektrolietoplossing die bestaat uit 0,53 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,14 g KH_2PO_4 , 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g NaN_3 (om biodegradatie tegen te gaan) en sporenelementen per liter.

Zuivering van het biosurfactant

Voor de zuivering van het geproduceerde polysaccharide biosurfactant is een gewijzigde methode gebruikt, zoals is beschreven in het rapport van fase I [Volkering en Noordman, 1996]. Het effluent uit de biosurfactantproductiereactor (2,6 L uit reactor B, geogst op 15/11/1996) is op pH 7 gebracht. Het effluent is gecentrifugeerd om biomassa te verwijderen (6.000 rpm gedurende 30 minuten). Vervolgens is aan het supernatant 1,3 L aceton toegevoegd, waardoor het biosurfactant precipiteert. Na het centrifugeren (7.000 rpm, 30 min) is de pellet geresuspendeerd in 1 L water. De verkregen troebele oplossing bevat ongeveer 3 g/L biosurfactant. Er is 200 mg/L natriumazide toegevoegd om biodegradatie tegen te gaan. Vanuit deze oplossing is per experiment de benodigde hoeveelheid gedurende 1 tot 8 uur bij 50.000 rpm gecentrifugeerd. Het supernatant, dat alle emulgerende activiteit bezit, is nog enigszins troebel. Na filtratie door een 0,45 : m filter is een heldere oplossing verkregen. Deze oplossing is verdund met een elektrolietoplossing en voor de experimenten gebruikt.

Kolomstudies

De met hexadecaan gecontamineerde silica (12 - 13 g) is gepakt in roestvrij stalen kolommen (7 cm lang, 2,25 cm diameter, preparatieve HPLC-kolommen, Alltech). Deze kolommen bevatten distributieschijven en 0,5 : m roestvrij stalen filters. Een HPLC-pomp (Alltech, model 301) is gebruikt om

oplossingen door de kolommen te pompen. Het effluent is naar een fractiecollector geleid en opgevangen in 8 mL pyrexbuizen. Er zijn steeds fracties van 7 mL opgevangen. Nadat de oplossingen de kolom zijn ingeleid, komen deze slechts in contact met roestvrij staal.

De kolommen zijn met 100 mL elektrolietoplossing doorspoeld met een debiet van 0,1 mL/min om de kolom met water te verzadigen. Gedurende deze periode is een verwaarloosbare hoeveelheid hexadecaan verwijderd ($< 0,04$). Hierna is het eigenlijke experiment begonnen door met een gekozen oplossing te elueren.

Met een niet-adsorberende tracer (pentafluorobenzoëzuur) zijn de hydrodynamische eigenschappen van de kolommen bepaald. De kolommen blijken goed gepakt en er heeft geen voorkeursstroming plaats, wat is gebleken uit de vorm van de doorbraakcurve (sigmoïdaal) en het hoge Péclet-nummer (> 50). De hoeveelheid water in de kolom (i.e. een porievolume of p.v.) is gravimetrisch bepaald op 18,5 - 19,3 mL. Gedurende de experimenten zijn debieten gebruikt tussen 0,10 en 0,50 mL/min. Dit komt overeen met een interstitiële snelheid van 2,3 tot 11,7 cm/h. Ook bij elutie met een oplossing die 500 mg/L polysaccharide biosurfactant bevat, is de druk over de kolommen kleiner dan 1 atmosfeer.

Kwantitatieve analyses

Om de concentratie van het polysaccharide biosurfactant in het effluent kwantitatief te meten, is de bruikbaarheid van suikeranalyses, emulgeringsassays en TOC-metingen getest. TOC-metingen geven de beste correlatie tussen de biosurfactantconcentratie en respons en geven bovendien een (van emulgerende werking) onafhankelijke waarde. Deze methode is verder gebruikt voor de bepaling van de concentratie van het biosurfactant in kolomeffluenten.

De concentratie van hexadecaan in het kolomeffluent is bepaald zoals is beschreven in het rapport van fase I. Aan elke fractie van het kolomeffluent in pyrexbuizen is 0,05 mL 5 N NaOH en 1 mL iso-octaan toegevoegd. Na vijf minuten intensief mengen en centrifugeren (3.000 rpm, 15 min) is de concentratie van hexadecaan in de iso-octaanlaag met gaschromatografie (GC) geanalyseerd.

De initiële concentratie van hexadecaan in silica is bepaald door 100 mg silica te extraheren met 2 mL iso-octaan en de iso-octaanlaag te analyseren met GC. De restconcentratie hexadecaan in het silica na de experimenten is in triplo bepaald door ongeveer 100 mg silica te extraheren met 2 mL ethanol en 2 mL iso-octaan. De iso-octaanlaag is met GC geanalyseerd. De exacte hoeveelheid ingewogen silica is na de extractie gravimetrisch bepaald. De restconcentratie hexadecaan is berekend door de concentratie in de iso-octaan door de hoeveelheid ingewogen silica te delen. Dit levert waarden met een standaarddeviatie van 3 %.

3.3 Resultaten en discussie

Elutie in aan- en afwezigheid van het polysaccharide biosurfactant

Om het effect van het polysaccharide biosurfactant op uitloging van hexadecaan te bepalen, zijn experimenten uitgevoerd met kolommen die gepakt zijn met hexadecaan gecontamineerde matrix. Bij elutie van deze kolommen met het polysaccharide biosurfactant is meer hexadecaan verwijderd dan bij elutie zonder biosurfactant (zie fig. 2). Kort nadat doorspoelen van de kolom met een biosurfactantoplossing (100 mg/L) is gestart, stijgt de concentratie van hexadecaan in het effluent tot 25 : M. Na doorstroming van de kolom met een hoeveelheid biosurfactantoplossing, die overeenkomt met 15 porievolumes daalt de effluentconcentratie tot ongeveer 5 : M. Bij elutie zonder biosurfactant is de effluentconcentratie van hexadecaan 2 : M. Dit verschil heeft tot gevolg dat na 20 porievolumes doorspoelen met een biosurfactantoplossing (100 mg/L) bijna negenmaal zoveel hexadecaan is verwijderd vergeleken met dezelfde behandeling zonder biosurfactant. Omdat ook na 20 porievolumes de effluentconcentratie bij behandeling met biosurfactant hoger is dan bij behandeling zonder biosurfactant, blijft het positieve effect van het biosurfactant niet beperkt tot de eerste fasen van behandeling. Het totale gedeelte hexadecaan dat gedurende dit experiment is verwijderd, is echter erg laag (respectievelijk 0,16 % bij elutie zonder biosurfactant en 1,4 % bij elutie met 100 mg/L biosurfactant; zie tabel 1). Totale verwijdering zal erg lange behandelertijden noodzakelijk maken.

Fig. 2. Verwijdering van hexadecaan bij elutie met polysaccharide biosurfactant, debiet 0,1 mL/min. Cumulatieve uitloging van hexadecaan als functie van het aantal doorspoelde porievolumes; biosurfactantconcentraties: 0 mg/L (•), 1000 mg/L (>), 500 mg/L (#) en 100 mg/L (!). Genormaliseerde effluentconcentratie (PS) van het biosurfactant (500 mg/L) tijdens verwijdering van hexadecaan (!).

Tabel 1. Invloed van het polysaccharide biosurfactant (PS) en het rhamnolipide biosurfactant (RL) op de verwijdering van hexadecaan uit het silica modelsysteem.

influent	doorspoel- (-)	oliegehalte		hexade- (mg) ^a	hexade- (mg)	massaba- (%) ^b	hexadecaan verwij- (%) ^c
		t = 0	t = eind				
mineraal medi-	34	7100	7900	92	0,38	113	0,16
PS, 100 mg/L	24	7900	7500	95	1,5	96	1,4
PS, 500 mg/L	37	8500	7700	111	0,79	90	0,32
PS, 1000 mg/L	22	7900	7700	102	0,52	97	0,50
RL, 500 mg/L	29	7100	5700	92	12	90	9,3

^a hoeveelheid silica in de kolom x hexadecaanconcentratie op t = 0

^b berekend als (hexadecaan in kolom op t = eind + hoeveelheid uitgelopen)/hoeveelheid hexadecaan in kolom op t = 0 x 100 %

^c hoeveelheid hexadecaan uitgelopen na 20 porievolumes/hoeveelheid initieel aanwezig x 100 %

Transport van het polysaccharide biosurfactant

De doorbraakcurve van het polysaccharide biosurfactant door de kolom is bekeken om aan te tonen of de stijging van de effluentconcentratie van hexadecaan gelijktijdig plaatsheeft met de doorbraak van het biosurfactant. Hiervoor is een met hexadecaan gecontamineerde kolom doorspoeld met een biosurfactantoplossing (500 mg/L) en is de concentratie van biosurfactant en de concentratie van hexadecaan in het effluent geanalyseerd. Ongeveer een porievolume nadat elutie is gestart, breekt het biosurfactant door (zie fig. 2). Dit veroorzaakt gelijktijdig een stijging van de concentratie van hexadecaan in het effluent. De snelle doorbraak geeft aan dat het biosurfactant vrijwel geen interactie met de matrix heeft. Het is aannemelijk dat het snelle transport van het biosurfactant mede wordt veroorzaakt door het hoge molecuulgewicht: daardoor kan het biosurfactant niet in de kleine poriën van het silica doordringen ("size exclusion" effect). Met dit mechanisme wordt verklaard dat organisch materiaal sneller door bodems wordt getransporteerd dan water [Magee et al., 1991].

Effect van de concentratie van het polysaccharide biosurfactant

De concentratie van het biosurfactant heeft een belangrijk effect op de verwijdering van hexadecaan. Er is gewerkt met oplossingen die 100 mg/L, 500 mg/L en 1000 mg/L polysaccharide biosurfactant bevatten. Het effluent van de reactor, waarin de biosurfactants zijn geproduceerd, bevat 1000 mg/L polysaccharide biosurfactant. Bij elutie met 100 mg/L biosurfactant is echter het meeste hexadecaan verwijderd (zie fig. 2 en tabel 1). Er is in dit concentratiegebied dus geen positieve correlatie gevonden tussen de concentratie biosurfactant en de hoeveelheid verwijderd hexadecaan, terwijl bekend is dat de solubilisatie van een hydrofobe verbinding lineair afhankelijk is van de concentratie surfactant [Pennell et al., 1993; Diallo et al., 1994; Wilson et al., 1994] en de grensvlakspanning constant is bij toename van de surfactantconcentratie (boven de CMC). Blijkbaar wordt verwijdering van hexadecaan niet alleen bepaald door de solubiliserende werking van het biosurfactant of door de verlaging van de grensvlakspanning, maar spelen ook andere processen een rol.

Verwijdering van hexadecaan is kinetisch gelimiteerd

Na elutie van een met hexadecaan gecontamineerde kolom met oplossingen met en zonder biosurfactant gedurende meer dan 20 porievolumes, is elutie gedurende 2 tot 72 h gedisciplineerd. Gedurende deze periode hebben eventuele trage processen de tijd om evenwicht te bereiken. Na hervatting van elutie is de concentratie hexadecaan in het effluent in beide gevallen hoger dan voor de flow-interruptie (zie fig. 3A-B). Hieruit blijkt dat verwijdering van hexadecaan kinetisch gelimiteerd is. Desorptie-, oplos- en diffusieprocessen kunnen hiervoor verantwoordelijk zijn.

Een positieve correlatie tussen de concentratie van hexadecaan in het effluent en de flow-interruptietijd is niet gevonden bij de onderzochte interruptietijden (2 - 72 h). Deze relatie was verwacht omdat bij een langere interruptietijd het proces meer evenwicht bereikt. Gedurende eerdere flow-interrupties is meer hexadecaan verwijderd dan gedurende latere. Dit kan worden veroorzaakt door de aanwezigheid van meer en minder "beschikbaar" hexadecaan (de buitenkant van de deeltjes versus diep in de poriën) en door een verkleining van het hexadecaan-wateroppervlak gedurende het experiment.

Voor een vergelijking van het effect van flow-interrupties in aanwezigheid en afwezigheid van het biosurfactant zijn de effecten van de laatste flow-interrupties (72 h) vergeleken. In het experiment met polysaccharide biosurfactant zijn de hexadecaanconcentraties in het effluent na hervatting van elutie hoger dan in het experiment zonder polysaccharide biosurfactant (respectievelijk 5 : M en 38 : M). Ten dele kan dit worden veroorzaakt door solubilisatie (vergroete concentratiegradiënt), maar waarschijnlijk ook door een directe invloed van het biosurfactant op een van bovengenoemde kinetisch-gelimiterde processen.

Zowel in aanwezigheid als in afwezigheid van het biosurfactant is per tijdseenheid minder hexadecaan verwijderd bij intermitterend pompen dan bij continue elutie. In aanwezigheid van 500 mg/L biosurfactant is 0,08 mg hexadecaan verwijderd gedurende de twee uur na de interruptie van elutie van 72 h (gebaseerd op de laatste flow-interruptie; zie fig. 3B). Bij continue pompen zal gedurende 74 h ongeveer 0,14 mg zijn verwijderd. Er kan dus een hogere effectiviteit worden behaald wanneer er continu wordt doorstroomd. Per hoeveelheid biosurfactant is een beter resultaat bereikt bij intermitterend pompen. Het bestaan van niet-evenwichtsprocessen is van belang omdat deze grenzen stelt aan de tijd waarin reiniging kan worden behaald. Doordat het biosurfactant deze processen versnelt, moet een kortere reinigingstijd mogelijk zijn.

Fig. 3. Effect van intermitterend pompen op de verwijdering van hexadecaan. Na circa 20 p.v. elutie is gestopt met pompen (tijdsduur in figuur, h). Vervolgens is het pompen hervat (debiet 0,1 mL/min). A. Elutie zonder biosurfactant (•, linker y-as). B. Elutie met 500 mg/L polysaccharide biosurfactant (#, linker y-as). C. Elutie met 500 mg/L rhamnolipide biosurfactant (◊, rechter y-as).

Effect van het debiet

Omdat het debiet een belangrijke procesparameter is, die vooral in een niet-evenwichtssituatie het verloop van de reiniging bepaalt, is het effect van het debiet op de verwijdering van hexadecaan getest. Tijdens elutie van hexadecaan uit een kolom met een polysaccharide biosurfactantoplossing (500 mg/L), wordt het debiet stapsgewijs gevarieerd (van 12 tot 2 cm/h). In het experiment is waargenomen dat de effluentconcentratie hoger is bij lagere debieten, al is de spreiding van data van dezelfde grootte als het effect van het debiet (zie fig. 4). Per tijdseenheid is wel minder hexadecaan verwijderd bij het gebruik van lagere debieten. Bij kinetisch-gelimiteerde verwijdering wordt een hogere effluentconcentratie bij lagere doorstroomsnelheden verwacht. Bij gebruik van lage debieten kan hierdoor een grotere procesefficiëntie - dat wil zeggen een grotere verwijdering van hexadecaan per hoeveelheid toegevoegd biosurfactant of geëluëerd volume - worden bereikt.

Fig. 4. Effect van het debiet op de verwijdering van hexadecaan. De effluent hexadecaanconcentratie bij elutie met 500 mg/L biosurfactant (!) is gegeven. Tijdens het experiment is het debiet veranderd van 0,1 naar 0,5, 0,2 en 0,1 mL/min (----). In een duplo experiment is het debiet constant gehouden op 0,1 mL/min (#). Inzet: Gemiddelde concentratie van hexadecaan in het effluent (C_{eff}) als functie van het debiet (!, #).

Vergelijking met rhamnolipide biosurfactants

Het effect van het polysaccharide biosurfactant op de verwijdering van hexadecaan vanuit silica is vergeleken met het effect van rhamnolipide, een biosurfactant geproduceerd door verschillende *Pseudomonas* sp. (zie fig. 5). Ongeveer 10 porievolumes nadat is gestart met het toedienen van rhamnolipide (500 mg/L) aan de kolom, breekt het biosurfactant door. Vervolgens stijgt de concentratie van hexadecaan in het effluent tot 250 : M. Na 20 porievolumes doorspoeling is 9,3 % van de initieel aanwezige hexadecaan verwijderd (zie tabel 1).

Fig. 5. Verwijdering van hexadecaan vanuit silica bij elutie met 500 mg/L rhamnolipide biosurfactant. Cumulatieve uitloging bij een debiet van 0,1 mL/min als functie van het aantal doorspoelde p.v. (,). Doorbraak van rhamnolipide biosurfactant (500 mg/L) tijdens verwijdering van hexadecaan (!). De genormaliseerde effluentconcentratie (RL) is weergegeven ($C_{\text{effluent}}/C_{\text{influent}}$).

Ook in aanwezigheid van het rhamnolipide biosurfactant is na interruptie van elutie een verhoogde hexadecaanconcentratie gemeten (zie fig. 3C). Deze concentraties zijn veel hoger dan na flow-interruptie bij elutie met het polysaccharide biosurfactant. Dit geeft aan dat rhamnolipide meer invloed heeft dan het polysaccharide biosurfactant op de kinetisch-gelimiteerde processen die de verwijdering van hexadecaan bepalen, of dat in aanwezigheid van rhamnolipide andere processen een rol spelen dan in aanwezigheid van het polysaccharide biosurfactant.

De grotere effectiviteit van het rhamnolipide biosurfactant kan worden veroorzaakt doordat de hexadecaan-solubiliserende werking van dit biosurfactant groter is. Ook is het mogelijk dat desorptie meer wordt versneld door het rhamnolipide biosurfactant dan door het polysaccharide biosurfactant, omdat het rhamnolipide biosurfactant beter in de silicaporiën kan doordringen en zo beter het hexadecaan-watergrensvlak kan bereiken.

Vergelijking met natuurlijke bodem

In een zandige bodem is verwijdering van dodecaan door een nonionic surfactant vanuit een zandige bodem bestudeerd [Pennell et al., 1993]. Ook hier is een negatieve correlatie gevonden tussen het debiet en de effluentconcentratie en is de effluentconcentratie na flow-interruptie hoger dan ervoor. Dit duidt aan dat de kinetische limitatie die in het silica modelsysteem is bestudeerd ook in natuurlijke bodem optreedt en dat de hier gepresenteerde resultaten relevant zijn om een inschatting te maken van het potentieel van het biosurfactant voor praktische toepassing.

3.4 Conclusies

Het polysaccharide biosurfactant versnelt de verwijdering van in silica geïmmobiliseerd hexadecaan. Na elutie met een biosurfactantoplossing (100 mg/L) gedurende 20 porievolumes is negenmaal zoveel hexadecaan verwijderd dan bij elutie in afwezigheid van biosurfactant. Dit wordt niet alleen veroorzaakt doordat het biosurfactant hexadecaan emulgeert, maar waarschijnlijk ook doordat het biosurfactant de kinetisch-gelimiteerde processen, die de verwijdering van hexadecaan bepalen, versnelt. Het effect van het polysaccharide biosurfactant op de verwijdering van hexadecaan is echter veel kleiner dan het effect van het rhamnolipide biosurfactant onder dezelfde omstandigheden.

Bij lagere debieten en intermitterend pompen zijn hogere effluentconcentraties bereikt dan bij hogere debieten en continu pompen, maar is per tijdseenheid minder vracht verwijderd. Efficiëntie (vracht verwijderd per hoeveelheid geïnvesteerd biosurfactant en materieel) en effectiviteit (vracht verwijderd per tijdseenheid) moeten tegen elkaar worden afgewogen bij de keuze van het debiet en de eventuele toepassing van intermitterend pompen in een praktijksituatie. Bij biologische reiniging van het effluent is een hogere concentratie hexadecaan een voordeel, omdat minder volume behoeft te worden gereinigd en relatief minder biosurfactant aanwezig is dat als preferentieel substraat kan dienen. De verhouding tussen olie en biosurfactant in het effluent (w/w) varieert van maximaal 5 % tot (kleiner dan) 1 % bij continu pompen (100 mg/L polysaccharide biosurfactant, 0,1 mL/min). Bij intermitterend pompen kan deze verhouding 12 % bedragen. Ook daarom is het gebruik van intermitterend pompen aan te bevelen. Het gekozen modelsysteem geeft vergelijkbare resultaten als die behaald met een zandgrond. Op grond van de hierboven gepresenteerde resultaten lijken lagere concentraties van het biosurfactant (100 mg/L) en lage debieten het meest geschikt te zijn bij toepassing van deze biosurfactants voor biologische *in situ* sanering van een met olie vervuilde zandgrond.

BEPALING VAN HET EFFECT VAN BIOSURFACTANTS OP DE VERWIJDERING VAN MINERALE OLIE UIT VERONTREINIGDE GROND

4.1 Inleiding

Het voor dit project belangrijkste criterium voor de effectiviteit van de geproduceerde biosurfactants is het stimuleren van de verwijdering van olie uit grond van het verontreinigde terrein. Dit kan zowel gebeuren door verhoging van de snelheid van biologische afbraak als door versnelde uitspoeling. Om het effect van de biosurfactants te bepalen zijn twee series kolomexperimenten met gestoken grondmonsters uit de meest verontreinigde zone van het terrein uitgevoerd, waarbij een vergelijking is gemaakt tussen de verwijdering van minerale olie bij doorspoeling met water en die bij doorspoeling met verschillende biosurfactantoplossingen. Om onduidelijkheden in de resultaten te voorkomen is ervoor gekozen geen extra zuurstof toe te voegen ter bevordering van de biodegradatie.

4.2 Materialen en methoden

Monstername

De monsters zijn afkomstig van het met olie vervuilde terrein te Roermond. De bodem ter plaatse bestaat voornamelijk uit grof zand, met op circa 2 - 2,5 m-mv een ondoorlatende kleilaag. De meest verontreinigde zone bevindt zich in het zand direct boven de kleilaag, waar een drijfslag van zware minerale olie aanwezig is. Bij de monstername zijn zo dicht mogelijk bij elkaar 18 steekmonsters (lengte 60 cm, diameter 7 cm) van de laag direct boven de kleilaag genomen. De steekmonsters zijn afgesloten bij 4 °C bewaard tot het begin van de uitloogexperimenten.

Constructie van de grondkolommen

Om vanuit de steekmonsters grondkolommen te maken, zijn de monsters aan de kant van de kleilaag geopend en de bovenste 5 - 10 cm grond (klei) is verwijderd. Vervolgens is in de grote steekbuis een kleinere steekbuis (lengte 21 cm, diameter 3,7 cm) geslagen. Nadat deze steekbuis uit de grondkolom is verwijderd, is aan beide zijden 1,5 cm grond vervangen door fijn grind en een laagje glaswol, waarna de kolommen zijn afgesloten. De overgebleven grond uit het steekmonster is gebruikt om de aanvangsconcentratie aan minerale olie in de grond te bepalen. Op deze manier zijn grondkolommen met een volume van circa 185 ml en een hoeveelheid grond van circa 300 gr drooggewicht verkregen. Er is aangenomen dat het porievolume van de kolommen 65 ml was.

Uitloogexperimenten

Het ontwerp van de uitloogexperimenten is schematisch weergegeven in figuur 6. Bij de opzet is gebruik gemaakt van literatuurgegevens over kolomexperimenten met surfactants [Ducreux et al., 1995; Duggan et al., 1994; Scheibenbogen et al., 1994]. Vloeistof (voor de samenstelling zie tabel 2) wordt bij kamertemperatuur gedurende 1 maand door de kolom (C) gepompt met een debiet van circa 1 porievolume per dag, zodat in totaal circa 30 porievolumes worden doorspoeld. De uitgaande vloeistof komt via een monsternamevatje (D) terecht in een opvangvat (E) met een volume van 500 ml. In dit vat is 3 ml 12 M H_2SO_4 aanwezig om de pH van de opgevangen vloeistof lager dan 2 te houden. Hierdoor ontwijkt eventueel geproduceerd CO_2 en wordt biologische activiteit in het opvangvat voorkomen. Gas uit het opvangvat wordt door een val met 20 ml 3 M NaOH (F) geleid om CO_2 af te vangen.

Fig. 6. Schematische weergave van de uiloogexperimenten. A = influent, B = pomp, C = grondkolom, D = meetvatje, E = effluent en F = loogval.

Tijdens de experimenten zijn de volgende parameters bepaald:

- dagelijks O_2 -concentratie, pH en volume van het effluent;
- olieconcentraties in het influent;
- achtmaal olieconcentratie in het effluent: bepaling door extractie met hexaan en analyse met GC van monsters die vooraf op pH = 12 zijn gebracht;
- viermaal CO_2 -concentratie in de loogval door titratie met zuur;
- eindconcentratie van olie in de grondkolommen door extractie met hexaan en analyse met GC (bij kolommen met biosurfactants is loog toegevoegd tot een pH van 12).

De experimenten zijn uitgevoerd in 2 opeenvolgende series van 6 kolommen. Bij de eerste serie is het effect van de productiewijze en van de verdunning (met mineraal medium) van de biosurfactantoplossingen onderzocht. Hierbij zijn twee abiotische blanco's uitgevoerd. Ter controle van de steriliteit bij deze blanco's is het effluent van de kolommen afgestreken op pepton-agar platen. In de oorspronkelijke opzet was de tweede serie een duplo van de eerste serie experimenten. Omdat er in de eerste serie echter weinig biologische activiteit (CO_2 -productie) is waargenomen, zijn bij de tweede serie geen abiotische blanco's uitgevoerd. In plaats daarvan is het effect van het toevoegen van nitraat (alternatieve elektronenacceptor) onderzocht. Tevens is de tweemaal verdunde biosurfactantoplossing C niet meer gebruikt. De verdunningen zijn bij deze serie vooraf vastgesteld aan de hand van de viscositeit van de reactorvloeistof (zie viscositeitsmetingen). Voorafgaand aan de verdunning zijn de reactorvloeistoffen grof gefiltreerd over een filterkous om grote deeltjes, die de pompslang kunnen verstoppen, te verwijderen.

De samenstelling van de influenten bij beide series experiment is gegeven in tabel 2. De emulgerende activiteit (E_{24}) van de oorspronkelijke onverdunde biosurfactantoplossingen ligt tussen de 40 en 60 %.

Tabel 2. Samenstelling van de influenten.

eerste serie		tweede serie	
code	influent	code	influent
1A	mineraal medium	2A	tweemaal verdunde biosurfactantoplossing A
1B	tweemaal verdunde biosurfactantoplossing B	2B	tweemaal verdunde biosurfactantoplossing B
1C	tweemaal verdunde biosurfactantoplossing C	2C	driemaal verdunde biosurfactantoplossing C
1D	driemaal verdunde biosurfactantoplossing C	2D	driemaal verdunde biosurfactantoplossing C + nitraat
1E	mineraal medium + HgCl	2E	mineraal medium
1F	tweemaal verdunde biosurfactantoplossing C + HgCl	2F	mineraal medium met nitraat

Doorbraak van natriumchloride

Met één aparte grondkolom is een natriumchloridedoorbraak experiment uitgevoerd. Bij aanvang van het experiment is de kolom met een debiet van circa 1 porievolume per dag doorspoeld met gedestilleerd water. Van het effluent is de geleidbaarheid bepaald als maat voor de NaCl-concentratie. Na 1 dag is een constante geleidbaarheid in het effluent gemeten en is het influent vervangen door een 1,0 g/L NaCl-oplossing. De geleidbaarheid van het effluent is gevolgd totdat gedurende 8 uur een constante waarde hiervoor is waargenomen.

Bepaling van de drukval over de kolom

De druk die nodig is om de verschillende vloeistoffen door een grondkolom te pompen, is bepaald in een apart kolomexperiment. De druk is elke 15 minuten gemeten met behulp van een druksensor die tussen de pomp en de kolom wordt geplaatst. De experimenten zijn gestart door met een debiet van circa 1 porievolume per dag water door de kolom te pompen tot een constante druk is gemeten. Dit is vervolgens herhaald met steeds minder verdunde biosurfactantoplossingen totdat een dermate hoge druk is bereikt dat geen vloeistof meer door de kolom kan worden gepompt.

De viscositeit van vloeistoffen is bepaald door bij kamertemperatuur de uitstroomtijd door een capillair te meten. Voor de omrekening is een ijklijn gemaakt door de uitstroomtijd van 4 vloeistoffen met een bekende viscositeit (aceton, water, ethanol en 50 % glycerol) bij dezelfde temperatuur te bepalen. De viscositeiten van aceton, water, ethanol en 50 % glycerol bij 21 °C zijn respectievelijk 0,33, 0,8, 1,2 en 6,0 mP.s [Weast en Lide, 1990]. Tussen de uitstroomtijd en de viscositeit is een lineair verband gevonden.

4.3 Resultaten en discussie

4.3.1 Eerste serie uitloogexperimenten

Een overzicht van de belangrijkste resultaten van de eerste serie uitloogexperimenten is gegeven in tabel 3. Deze resultaten worden hierna puntsgewijs toegelicht.

Tabel 3. Resultaten van de eerste serie uitloogexperimenten.

ko- lom	influent	doorspoel- de porievolu- mes (-)	oliegehalte (mg/kg.ds)		olie initieel (mg)	olie uitge- loogd (mg)	CO ₂ geprodu- ceerd (mmol)	maximale biodegrada- tie ^b (mg)	olie verwij- derd (%)	
			t = 0	t = eind					I ^c	II ^d
1A	mineraal medium	31,2	12900	14900	3712	0,19	1,38	26,1	-15, 5	0,00 5
1B	biosurfactantoplos- sing B, tweemaal	14,4	14200	13500	4293	47,6	1,11	21,0	4,93	1,11
1C	biosurfactantoplos- sing C, tweemaal	32,1	7000	5800	1864	398,1	1,57	29,7	17,1	21,4
1D	biosurfactantoplos- sing C, driemaal	42,6	5100	5400	1411	343,4	4,62	87,3	-5,8 8	24,3
1E	mineraal medium + HgCl	30,4	4000	5900	1213	0,23	0,7	13,2	-47, 5	0,02
1F	biosurfactantoplos- sing C, tweemaal verdund + HgCl	22,2	5800	5300	1802	268,8	0,25	4,72	8,62	14,9

^a hoeveelheid grond in de kolom x olieconcentratie op t = 0

^b aannemende dat alle CO₂ afkomstig is van olie-afbraak volgens formule: C₁₂H₂₆ + 15 O₂ → 6 CO₂ + biomassa

^c I: uitgaande van begin- en eindgehalten in de grondkolommen

^d II: uitgaande van het begingehalte in de grond en de hoeveelheid uitgeloopte olie in het effluent, zonder rekening te houden met biodegradatie

Uitspoeling van minerale olie

De uitgeloopte hoeveelheid minerale olie (berekend uit olieconcentraties in de effluenten) bij de eerste serie kolomexperimenten is in figuur 7 cumulatief weergegeven als functie van het aantal doorspoelde porievolumes. Het is duidelijk te zien dat bij de experimenten waar geen surfactants zijn gebruikt (open symbolen in de figuur) nauwelijks olie in het effluent is gevonden, terwijl ook nauwelijks biodegradatie (CO₂-productie) is waargenomen. De grond in deze kolommen (A en E) bevat echter hoge olieconcentraties. Omdat bij de bepaling van de chloridedoorbraakcurve is gebleken dat er weinig voorkeursstroming in de kolommen optreedt, kan hieruit worden geconcludeerd dat deze olie een lage (bio)beschikbaarheid heeft. Wanneer biosurfactantoplossingen als influent zijn gebruikt, kan wel een duidelijke uitspoeling van minerale olie worden waargenomen. Hierbij moet worden opgemerkt dat kolommen met influenten afkomstig van reactor C (kolommen C, D en F) ook minerale olie bevatten (respectievelijk 23, 15 en 23 mg/L). Bij het berekenen van de effluentconcentraties is hiervoor gecorrigeerd.

Bij het gebruik van de tweemaal verdunde biosurfactantoplossing B (kolom B) zijn slechts 14,4 porievolumes door de kolom gepompt. De reden hiervoor is dat bij de kolom verstoppingen optreden en dat na 14,4 porievolumes de druk die nodig is om de vloeistof door de kolom te pompen zo hoog wordt dat de pomp niet meer in staat is vloeistof te verpompen.

Fig. 7. Cumulatieve uitloging van minerale olie, eerste serie uitloogexperimenten.

Wanneer voor de verschillen in het aantal doorspoelde porievolumes wordt gecorrigeerd, blijkt dat bij alle experimenten met biosurfactantoplossing C (kolommen C, D en F) ongeveer een gelijk percentage van de olie is uitgespoeld (17 - 20 % bij 30 p.v.). Bij elutie met oplossing B is de gecorrigeerde uitspoeling van olie duidelijk lager dan die met de andere biosurfactantoplossingen (2,3 % bij 30 p.v.). Dit was van te voren niet verwacht, omdat de emulgerende activiteit van de oplossingen B (geproduceerd met zonnebloemolie als substraat) en C (geproduceerd met een mengsel van zonnebloemolie en minerale olie als substraat) ongeveer gelijk is.

Biologische activiteit

Er wordt weinig biologische activiteit (CO₂-productie) gevonden tijdens de experimenten: de hoogst gemeten hoeveelheid CO₂ (kolom D) kan slechts afbraak van 5 % van de aanwezige olie betekenen. Omdat ook biosurfactants kunnen worden afgebroken, is de totale hoeveelheid olie die is afgebroken in werkelijkheid lager. Bij de berekening van de verwijdering (zie laatste kolom in tabel 3) is dan ook geen rekening gehouden met de mogelijke biodegradatie, zodat de werkelijke verwijdering nog hoger kan uitvallen.

De geringe biologische activiteit is logisch, omdat het niet de opzet van de experimenten is geweest om biologische activiteit te stimuleren, maar om het effect van de surfactants op de mobiliteit van de olie te bepalen. Zuurstoftoevoer heeft alleen plaats via de in het influent opgeloste zuurstof, zodat de totale hoeveelheid toegevoerd zuurstof klein is. Bij een oplosbaarheid van 10 mg/L wordt met 40 porievolumes (2,6 L) vloeistof maximaal slechts 26 mg O₂ toegevoerd; dit is bij benadering genoeg voor de aërobe afbraak van 8,5 mg olie (0,2 - 0,7 % van de initiële hoeveelheid olie). De zuurstofconcentratie in de effluënten van de kolommen varieert tussen de 0 en de 0,3 mg/L. Zintuiglijk is aan het eind van het experiment vastgesteld dat bij de kolommen B, C en D sulfatreductie heeft plaatsgehad (H₂S-geur). Er kan dus worden geconcludeerd dat er in de kolom anaërobe biologische activiteit is opgetreden. Het gebruik van HgCl heeft niet tot een complete remming van de CO₂-productie geleid (zie tabel 3). Omdat door middel van uitplaten van het onverdunde effluent op pepton agar is gebleken dat in het effluent nog micro-organismen kunnen groeien, kan worden geconcludeerd dat de kolommen E en F niet geheel abiotisch zijn.

Overall resultaten

In de laatste twee kolommen van tabel 3 wordt de verwijdering van olie, berekend uit de verwijdering door uitspoeling, vergeleken met de resultaten van de begin- en eindconcentraties van de grond in de kolommen. De resultaten vertonen geen goede overeenkomst. Dit geldt met name voor de kolommen A, D en E. Bij de kolommen A en E, waar gedurende de experimenten alleen mineraal medium doorheen is geleid, is een aanzienlijke verhoging van de olieconcentratie gemeten (15,5 resp. 47,5 %). Hierbij zijn de eindgehalten in duplo bepaald; de begingehalten zijn in enkelvoud bepaald. De spreiding in de metingen van de concentraties in de grondmonsters is dus te groot om op basis hiervan duidelijke conclusies te trekken.

4.3.2 Tweede serie uitloogexperimenten

Bij de opzet van de tweede serie experimenten is rekening gehouden met de problemen en resultaten van de eerste serie. Wegens de geringe biologische activiteit en problemen met het gebruik van HgCl zijn geen abiotische blanco's meegenomen, in plaats daarvan is het effect van de toevoeging van nitraat (alternatieve elektronenacceptor) onderzocht. Daarnaast is met de verdunning van de biosurfactantoplossingen rekening gehouden met de viscositeit ervan. In aparte experimenten (zie 4.3.3) is een goede correlatie tussen de viscositeit van de influentvloeistof en de druk over de kolom gevonden. De gebruikte verdunningen zijn zo gekozen dat geen problemen met de druk kunnen worden verwacht. Een overzicht van de resultaten van de tweede serie uitloogexperimenten is gegeven in tabel 4.

Tabel 4. Resultaten van de tweede serie uitloogexperimenten.

ko- lom	influent	doorspoel- de porievolu- mes (-)	oliegehalte (mg/kg.ds)		olie initieel ^a (mg)	olie uitgeloogd (mg)	CO ₂ geprodu- ceerd (mmol)	maximale biodegrada- tie ^b (mg)	olie verwij- derd %	
			t = 0	t = eind					I ^c	II ^d
2A	biosurfactantoplos- sing A, tweemaal	36,4	6781	5582	1962	216 (11,0)	4,02	75,9	17,7	11,0
2B	biosurfactantoplos- sing B, tweemaal	28,0	9600	11273	3820	104 (2,7)	3,44	65,0	-17, 4	2,7
2C	biosurfactantoplos- sing C, driemaal	38,9	6332	3956	1293	142 (11,0)	3,61	68,2	37,5	11,0
2D	biosurfactantoplos- sing C, driemaal verdund + 400 mg	31,0	8728	10886	3727	139 (3,7)	6,19	116,9	-24, 7	3,7
2E	mineraal medium	22,1	3831	3787	1217	1,4 (0,12)	0,12	2,27	1,5	0,12
2F	mineraal medium + 400 mg/L nitraat	22,9	7010	9519	3226	2,2 (0,07)	0,24	4,53	-35, 8	0,07

^a hoeveelheid grond in de kolom x olieconcentratie op t = 0

^b aannemende dat alle CO₂ afkomstig is van olie-afbraak volgens formule: C₁₂H₂₆ + 15 O₂ → 9 CO₂ + biomassa

^c I: uitgaande van begin- en eindgehalten in de grondkolommen

^d II: uitgaande van het begingehalte in de grond en de hoeveelheid uitgeloogde olie in het effluent, zonder rekening te houden met biodegradatie

Uitspoeling van minerale olie

De uitgeloopte hoeveelheid olie als functie van het aantal doorspoelde porievolumes is weergegeven in figuur 8. De resultaten van de tweede serie experimenten komen goed overeen met die van de eerste serie, namelijk geen olie in het effluent in de afwezigheid van biosurfactants en een duidelijke hoeveelheid olie in het effluent wanneer biosurfactantoplossingen als influent zijn gebruikt. Wel zijn de olieconcentraties in de effluents over het algemeen lager dan die van de eerste serie kolomexperimenten. De oorzaak hiervoor is niet bekend.

Ook bij de tweede serie experimenten is bij de kolommen met influent afkomstig uit reactoren A en C een hoeveelheid minerale olie aanwezig waarvoor gecorrigeerd is (A: 70 mg/L, C en D: 35 mg/L). Daarnaast blijkt ook in het influent afkomstig uit reactor B (alleen zonnebloemolie) minerale olie aanwezig te zijn. De verklaring hiervoor is dat een nieuw merk zonnebloemolie is gebruikt, dat bij analyse van olie duidelijke pieken veroorzaakt bij de fractie C32-C40. Omdat olie van de verontreinigde site vrijwel geen componenten met dezelfde retentietijden bevat, kan hiervoor eenvoudig worden gecorrigeerd door de waarden van de fracties C32-C40 van de gemeten waarden af te trekken. In bijlage A zijn de chromatogrammen van de olie van de verontreinigde site, van de reactorvloeistof van kolom B en van de zonnebloemolie, weergegeven, waarin te zien is dat het signaal van de zonnebloemolie vrijwel volledig buiten dat van de minerale olie valt.

Fig. 8. Cumulatieve uitloging van minerale olie, tweede serie uitloogexperimenten.

Ook na correctie voor het aantal doorspoelde porievolumes wordt de hoogste percentages olie verwijdering (ca. 9 % bij 30 p.v.) gevonden in de kolommen A en C. Beide kolommen zijn doorspoeld met een biosurfactantoplossing die is geproduceerd met een mengsel van minerale olie en zonnebloemolie als substraat. Evenals in de eerste serie is de verwijdering bij elutie met de met zonnebloemolie geproduceerde biosurfactantoplossing duidelijk lager (ca. 3 % bij 30 p.v.). Ook bij kolom D, waarbij nitraat aan het influent is toegevoegd, wordt een lagere uitspoeling waargenomen (ca. 3,5 % bij 30 p.v.). Een mogelijke verklaring hiervoor is de stimulering van de denitrificerende afbraak van de biosurfactants.

Biologische activiteit

De biologische activiteit (CO₂-productie) is iets hoger dan die bij de eerste serie experimenten. Het valt op dat alleen bij de kolommen waarbij biosurfactantoplossingen zijn gebruikt een significante CO₂-productie kan worden waargenomen. Hiervoor zijn twee verklaring denkbaar. Ten eerste kan al het geproduceerde CO₂ afkomstig zijn van de afbraak van de biosurfactants, ten tweede is het mogelijk dat het CO₂ deels afkomstig is van de afbraak van gemobiliseerde olie. Op basis van de resultaten kan geen uitspraak worden gedaan welk gedeelte afkomstig is van afbraak van olie. Via zintuiglijke waarnemingen na afloop van het experiment is vastgesteld dat in de kolommen A, B en C duidelijke zwavelreducerende activiteit heeft plaatsgehad.

Het toevoegen van nitraat als alternatieve elektronenacceptor (D en F) geeft alleen in de aanwezigheid van biosurfactant (D) een significante verhoging van de CO₂-productie. Hiervoor gelden dezelfde overwegingen als bij de kolommen zonder toevoeging van nitraat. Bij kolom D zijn geen zintuiglijke aanwijzingen voor zwavelreductie waargenomen.

Overall resultaten

De overall resultaten van de tweede serie experimenten zijn goed vergelijkbaar met die van de eerste. In de effluënten zonder biosurfactants wordt geen olie gevonden, wanneer biosurfactants worden gebruikt is er een duidelijke uitspoeling van olie. Door de grote onnauwkeurigheid in de bepalingen van olie in de grondmonsters is ook hier dit verschil niet terug te vinden wanneer naar de verandering van de olieconcentratie in de grond wordt gekeken.

4.3.3 Drukval over kolommen

Uit problemen bij het opstarten van de eerste serie kolomexperimenten zijn aanwijzingen verkregen dat de viscositeit van de vloeistof een bepalende factor is voor de druk die nodig is om de vloeistof door de kolommen te leiden. Daarom zijn van verschillende verdunningen van biosurfactantoplossing C de viscositeit van de vloeistof en de druk over de kolom bepaald. De resultaten van de drukmetingen zijn gegeven in bijlage B. Bij de 1 : 1 verdunde biosurfactantoplossing wordt een maximale druk van 700 mbar bereikt; bij deze druk blijkt het niet meer mogelijk vloeistof door de kolom te pompen. In figuur 9 zijn de resultaten van de viscositeits- en drukmetingen weergegeven als functie van de concentratie biosurfactantoplossing. De resultaten in deze figuur laten een sterke overeenkomst tussen de drukval over de kolom en de viscositeit van de vloeistof zien.

Fig. 9. Druk over de kolom (+) en viscositeit (?) van de vloeistof als functie van de verdunning van de biosurfactantoplossing.

ALGEMENE DISCUSSIE EN CONCLUSIES

Productie van biosurfactants

De productie van biosurfactants in de fed batch-reactoren verloopt over het algemeen probleemloos. Wel blijkt dat de productie van biosurfactants gevoelig is voor storingen in de aanvoer van het substraat (olie). Een relatief korte onderbreking van de olietoevoer (< 48 h) resulteert in een verstoring van de productie van biosurfactants gedurende twee fed batch-cycli (12 dagen). Bij de productie voor de tweede serie uitloogexperimenten is een nieuw merk zonnebloemolie gebruikt. Hoewel dit niet tot een merkbare verstoring van de productie van biosurfactants leidt, blijkt dat ten minste een fractie van de zonnebloemolie niet wordt afgebroken. Als gevolg hiervan zijn bij de tweede serie kolomexperimenten influenten gebruikt met vrij hoge olieconcentraties.

Effect van de biosurfactants op de verwijdering van hexadecaan uit een modelsysteem

Het gezuiverde polysaccharide biosurfactant versnelt de verwijdering van in silica geïmmobiliseerd hexadecaan. Na elutie met een biosurfactantoplossing (100 mg/L) gedurende 20 porievolumes is negenmaal zoveel hexadecaan verwijderd dan bij elutie in afwezigheid van biosurfactant. Dit wordt niet alleen veroorzaakt doordat het biosurfactant hexadecaan emulgeert, maar waarschijnlijk ook doordat het biosurfactant de kinetisch-gelimiteerde processen die de verwijdering van hexadecaan bepalen versnelt. Het effect van het polysaccharide biosurfactant op verwijdering van hexadecaan is echter veel kleiner dan het effect van het rhamnolipide biosurfactant onder dezelfde omstandigheden.

Bij lagere debieten en intermitterend pompen zijn hogere effluentconcentraties bereikt dan bij hogere debieten en continu pompen, maar is per tijdseenheid minder vracht verwijderd. Efficiëntie (vracht verwijderd per hoeveelheid geïnvesteerd biosurfactant en materieel) en effectiviteit (vracht verwijderd per tijdseenheid) moeten tegen elkaar worden afgewogen bij de keuze van het debiet en de eventuele toepassing van intermitterend pompen in een praktijksituatie.

Effect van de biosurfactants op de verwijdering van olie uit verontreinigde grond

De verwijdering van de olie uit de verontreinigde grond is op twee manieren beoordeeld:

- (i) door bepaling van de olieconcentraties in de effluënten;
- (ii) door bepaling van de oliegehalten in de grond voor en na de experimenten.

Wanneer wordt uitgegaan van de hoeveelheid olie die in de effluënten is gemeten, blijkt dat bij de experimenten zonder biosurfactants vrijwel geen olie wordt uitgelopen (0,005 - 0,12 % van de initiële hoeveelheid olie).

Omdat de grond hoge gehalten aan olie bevat (3000 - 14000 mg/kg d.s), kan worden geconcludeerd dat de beschikbaarheid van de olie laag is. Wanneer het influent biosurfactants bevat, wordt in alle gevallen een duidelijke uitspoeling van olie waargenomen (50 - 1000 maal meer dan zonder surfactants). Het percentage van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid olie dat is uitgespoeld bij de experimenten met surfactants varieert van circa 3 tot 24 %, afhankelijk van de initiële hoeveelheid olie, het aantal doorspoelde porievolumes en het type biosurfactantoplossing. Elutie met biosurfactantoplossingen die zijn geproduceerd met een mengsel van minerale olie en zonnebloemolie als substraat geeft een hogere uitspoeling van olie te zien dan elutie met biosurfactantoplossingen die zijn geproduceerd met alleen zonnebloemolie als substraat.

Als echter de olieconcentratie in de grond voor en na het uitlogen als criterium voor de effectiviteit van de surfactantoplossingen wordt gebruikt, zijn de resultaten veel minder duidelijk. In de experimenten zonder surfactants wordt een *toename* van de olieconcentratie van gemiddeld 24,3 % gemeten; in de experimenten met surfactants wordt een gemiddelde *afname* van 4,7 % gevonden. Hoewel de data statistisch gezien verschillen (T-toets), is de spreiding in de data echter dermate groot dat de betrouwbaarheid ervan als laag wordt beoordeeld.

Het grote verschil in de resultaten, die met de twee verschillende meetmethoden wordt gevonden, werpt de vraag op welke van de twee methoden het beste is. Er zijn verschillende redenen om aan te nemen dat meting van de olieconcentratie in het effluent het meest betrouwbaar is:

- bij meting in het effluent wordt het verschil tussen een klein getal (geen uitloging) en een groot getal (wel uitloging) vergeleken, terwijl bij meting van de gehalten in de grond twee grote getallen, namelijk 100 % en circa 75 - 100 %, met elkaar worden vergeleken;
- de metingen in het effluent vertonen een lagere spreiding dan die in de grond en volgen een duidelijke trend;
- de metingen in het effluent zijn vaker uitgevoerd (achtmaal per kolom) dan de metingen van de gehalten in de grond (tweemaal per kolom).

Daarom wordt gesteld dat de olieconcentraties in de effluenten de meest betrouwbare maat zijn voor de verwijdering van olie uit de grond. Op basis hiervan kan worden geconcludeerd dat het gebruik van de biosurfactants een duidelijke mobilisatie van de olie veroorzaakt.

In de bovenstaande discussie is geen rekening gehouden met de biodegradatieprocessen die tijdens de experimenten zijn opgetreden. Omdat de experimenten, met uitzondering van die met nitraattoevoeging, er niet op zijn gericht om de biodegradatie te stimuleren, is ook relatief weinig biologische activiteit gevonden. Bovendien is het niet mogelijk om de biologische activiteit (CO₂-productie) direct te relateren aan de afbraak van olie, omdat de biosurfactants biologisch afbreekbaar zijn en de geproduceerde CO₂ dus gedeeltelijk afkomstig is van de afbraak van surfactants.

Vergelijking van het modelsysteem en de grondkolommen

In zowel het modelsysteem als in de grondkolommen wordt een duidelijke verhoging van de verwijdering van olie gevonden bij het toepassen van de polysaccharide biosurfactants. Het effect is echter het grootst bij de experimenten met grond. Een mogelijke verklaring hiervoor is het verschil in de aard van de vaste fase.

Het gebruikte silica bevat microporiën (d = ca. 60 Å), terwijl de grond uit grof zand bestaat waarin weinig poriën aanwezig zijn. Grote moleculen als het polysaccharide biosurfactant dringen moeilijk door in microporiën en hebben dus geen effect op de daar aanwezige verontreiniging. Dit kan tevens het verschil verklaren dat in het modelsysteem is gevonden tussen het polysaccharide biosurfactant en het rhamnolipide biosurfactant, aangezien dit laatste type surfactant bestaat uit veel kleinere moleculen die wel in microporiën kunnen binnendringen. In een systeem met zand als vaste fase is op basis van het voorgaande een minder groot verschil tussen het polysaccharide biosurfactant en het rhamnolipide biosurfactant te verwachten dan in het modelsysteem met silica.

Een aanvullende verklaring voor de betere resultaten bij de experimenten met verontreinigde grond is het verschil in debiet in de beide systemen. Bij de experimenten met grond is het debiet circa 1 porievolume per dag, bij de experimenten met het modelsysteem is het debiet gevarieerd van circa 8 tot 40 porievolumes per dag. Omdat bij de experimenten met het modelsysteem bij lage debieten de hoogste effluentconcentraties zijn gevonden, kan het lage debiet bij de experimenten met grond de oorzaak zijn voor de hoge verwijdering van olie uit de verontreinigde grond.

Effect van de viscositeit

De viscositeit van een aantal van de geproduceerde biosurfactantoplossingen (met name van reactor B en C) is hoog. Uit de kolomexperimenten met grond is gebleken dat het gebruik van vloeistoffen met een hoge viscositeit problemen kan opleveren bij het doorstromen van de kolommen. Omdat de doorstroming ook in de praktijk een belangrijke factor is, is het aan te raden bij het gebruik van visceuze biosurfactantoplossingen deze te verdunnen tot een viscositeit die maximaal een factor twee- tot driemaal zo hoog is als die van water.

Implicaties voor de praktijk

Algemeen

Uitgaande van de hier gepresenteerde resultaten lijkt het mogelijk om met behulp van een techniek, waarbij on site op een eenvoudige manier biosurfactants worden geproduceerd, olie uit drijfvlagen in de bodem beter beschikbaar te maken. Om dit met meer zekerheid te kunnen stellen, is het noodzakelijk een pilot-plant experiment op de verontreinigde site uit te voeren. Hierbij zullen factoren, waarvan in het laboratorium is gebleken dat ze een belangrijke rol kunnen spelen (debiet, verdunningsfactor, intermitterende toevoer en effect van de surfactants op de doorlatendheid), moeten worden onderzocht. Zoals in elk geval van bodemsanering is de toepasbaarheid ervan afhankelijk van het rendement en de kosten. Het rendement van de toepassing van de surfactants zal per site verschillen en is dus vooraf moeilijk vast te stellen. Echter, bij stagnerende bodemsaneringen van met (zware) olie verontreinigde grond is de biobeschikbaarheid van de verontreiniging meestal de limiterende factor en ook gebruikelijke

technieken als bioventing en biosparging zullen dan niet het gewenste resultaat leveren. Omdat de toepassing van oppervlakte-actieve stoffen één van de weinige realistische mogelijkheden is om biobeschikbaarheidslimitaties te voorkomen, vormt de on site productie van biosurfactants een reële optie.

In bijlage B is een theoretisch ontwerp van het voorgestelde systeem gegeven met een bijbehorende kostenschatting. Aangezien de additionele kosten voor de productie en infiltratie van de biosurfactants vrij hoog zijn (f 50.000 tot f 60.000), lijkt de techniek bij voorbaat niet geschikt voor kleine verontreinigingen. Omdat de voornaamste kosten worden gevormd door investeringskosten en deze slechts in beperkte mate afhankelijk zijn van de grootte van het systeem kan uit financieel oogpunt de techniek het best worden toegepast bij zo omvangrijk mogelijke (stagnerende) bodemsaneringsprojecten.

Site-specifiek

Bij de experimenten, waarbij water als uitloogvloeistof is gebruikt, is geen noemenswaardige verwijdering van olie uit verontreinigde grond waargenomen (< 0,1 %). Ondanks het feit dat het hier geen zeer zware olie betreft, is de biobeschikbaarheid van de olie blijkbaar gering. In de praktijk moet op de site daarom weinig rendement van reiniging door grondwatercirculatie worden verwacht. Als de (bio)beschikbaarheid van de verontreiniging de limiterende factor is, is het de verwachting dat ook technieken als bioventing en biosparging weinig resultaat zullen opleveren. Op basis van de effluentanalyses bij de uitloogexperimenten lijkt het toepassen van biosurfactants een goede oplossing voor de geringe (bio)beschikbaarheid te zijn. In fase 3 van het project zal een pilot-plant voor de on site productie van biosurfactants bij in situ bodemreiniging worden ontworpen en worden getest op de verontreinigde locatie.

LITERATUUR

- Diallo, M.S., L.M. Abriola en W.J. Weber Jr., 1994.
Solubilization of nonaqueous phase liquid hydrocarbons in micellar solutions of dodecyl alcohol ethoxylates.
Environ. Sci. Technol. 28: 1829-1837.
- Ducreux, J., M. Bavière, P. Seabra, O. Razakarisoa, G. Schäfer en C. Arnaud, 1995.
Surfactant-aided recovery/in situ bioremediation for oil-contaminated sites.
In: R.E. Hinchee, J.A. Kittel, and H.J. Reisinger (eds.), Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons, p. 435-443, Battelle Press, Columbus, USA.
- Duggan, J.W., C.J. Bruell en D.K. Ryan, 1994.
In situ emulsification and mobilization of gaseoline range hydrocarbons using surfactants.
J. Soil Contam. 3: 159-182.
- Francy, D.S., J.M. Thomas, R.L. Raymond en C.H. Ward, 1991.
Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria.
J. Ind. Microbiol. 8: 237-246
- Hommel, R.K., 1990.
Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms.
Biodegradation 1: 107-119.
- Magee, B.R., L.W. Lion en A.T. Lemley, 1991.
Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous media.
Environ. Sci. Technol. 25: 323-331.
- Mihelcic J.R., D.R. Lueking, R.J. Mitzell and J.M. Stapleton (1993)
Bioavailability of sorpt- and separate- phase chemicals.
Biodegradation 4: 141-153
- Pennell, K.D., L.M. Abriola en W.J. Weber Jr., 1993.
Surfactant-enhanced solubilization of residual dodecane in soil columns: 1. Experimental investigation.
Environ. Sci. Technol. 27: 2332-2340.
- Scheibenbogen K., R.G. Zytner, H. Lee en J.T. Trevors, 1994.
Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants.
J. Chem. Technol. Biotechnol. 59: 53-59.
- Syldatk, C., S. Lang, F. Wagner, V. Wray en L. Witte, 1985.
Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* spec DSM 2874 grown on n-alkanes.
Zeitschrift Fuer Naturforschung Section C Biosciences 40C: 51.
- Van-Dyke, M.I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee en J.T. Trevors, 1993.
Pseudomonas aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactants: Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil.
Can. J. Microbiol. 39: 1071-1078.
- Volkering, F., 1996.
Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Proefschrift Landbouwniversiteit Wageningen.
- Volkering, F. en W.H. Noordman, 1996.

On site productie van biosurfactants bij in-situ bodemreiniging. Fase I: Optimalisatie van productie van biosurfactants tijdens de afbraak van minerale olie door gemengde cultures.
CUR/NOBIS rapportnr. 95-1-09, Gouda.

Weast, R.C. en D.R. Lide, 1990.
Handbook of chemistry and physics 70th edition.
CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA.

Wilson, D.J. en A.N. Clark, 1994.
Soil clean up by in-situ surfactant flushing. IV. A two-component mathematical model.
Separation Science and Technology 26: 1177-1194.

BIJLAGE A

**GC-CHROMATOGRAMMEN ZONNEBLOEMOLIE, REACTORVLOEISTOF B
EN MINERALE OLIE**

Fig. A1. GC-chromatogram zonnebloemolie.

Fig. A2. GC-chromatogram reactorvloeistof B.

Fig. A3. GC-chromatogram minerale olie verontreinigde grond.

BIJLAGE B

VERLOOP VAN DE DRUK BIJ DOORSPOELING MET VERSCHILLENDE VLOEISTOFFEN

Fig. B1. Verloop van de druk bij doorspoeling van de grondkolom met water en verschillende verdunningen van reactorvloeistof C; vanaf $t = 370$ h is lekkage opgetreden.

THEORETISCH ONTWERP VAN TOEPASSING VAN HET VOORGE- STELDE SYSTEEM

Principe

Bij sanering van een olieverontreiniging door grondwatercirculatie wordt een gedeelte van het opgepompte grondwater met verontreiniging gebruikt voor de on site productie van biosurfactants. Door infiltratie van de geproduceerde biosurfactants in de bodem wordt de (bio)beschikbaarheid van de verontreiniging in de bodem verhoogd.

Het voorgestelde systeem wordt toegepast bij een in situ sanering van een olieverontreiniging met een lage biobeschikbaarheid. Als gevolg hiervan zal in situ reiniging door grondwatercirculatie, bioventing of biosparging niet leiden tot voldoende verwijdering van de verontreiniging.

Vooronderzoek

Uit experimenteel onderzoek op laboratoriumschaal is gebleken dat de productie het best verloopt in een aërobe fed batch-bioreactor, dat wil zeggen een batch-reactor waaraan continu substraat (een mengsel van minerale olie en zonnebloemolie) wordt toegevoegd. Het is gebleken dat toepassing van de biosurfactants de mobiliteit van olieverontreinigingen aanmerkelijk kan verhogen.

Aannamen

Er wordt uitgegaan van de volgende gegevens, die deels op de resultaten van het vooronderzoek zijn gebaseerd:

- grondwatercirculatie met een debiet van 10 m³/h;
- een verontreiniging waar 4000 L minerale olie als drijfslaag aanwezig is;
- een productiereactor met een volume van 2 m³;
- toevoer van 4 L/dag van een mengsel van 1 : 2 minerale olie : zonnebloemolie;
- een productietijd van 7 dagen per batch;
- een uiteindelijke biosurfactantoplossing met een emulgerend vermogen van 40 - 60 %;
- 20 mg/L olie in het onttrokken water bij toepassing van de biosurfactants;
- zonder biosurfactants wordt geen olie uit de drijfslaag gemobiliseerd;
- de olie wordt alleen onder aërobe omstandigheden in de bodem afgebroken.

Theoretische uitwerking

Een schematische weergave van het voorgestelde systeem is gegeven in figuur C1.

Uit de aannamen volgt dat slechts een klein deel (0,12 %) van het onttrokken water in de reactor voor de productie van biosurfactants komt. De biosurfactantoplossing zal, afhankelijk van de viscositeit, bij de injectie in de bodem circa vijfmaal worden verdund met water uit de zuiveringsreactor om de viscositeit van het infiltraat te verlagen. Hierdoor kunnen eventuele verstoppingsproblemen worden voorkomen. Er is geen invulling aan technische details van de infiltratie.

De zuurstoftoevoer door de grondwatercirculatie is 10 m³/h \times 10 mg/L = 100 g/h.

Uitgaande van een bruto vergelijking: C₁₂H₂₆ + 15 O₂ → 6 biomassa + 9 CO₂ + 11 H₂O is de maximale theoretische hoeveelheid olie die met de toegevoegde zuurstof kan worden afgebroken 35,4 g olie/h, wat ongeveer overeenkomt met 44 ml/h = 7,7 L per 7 dagen. De biodegradatie kan eventueel worden gestimuleerd door het inbrengen van zuurstof via persluchtinjectie. Nadeel hierbij is dat hierdoor ook de afbraak van de biosurfactants wordt gestimuleerd.

Fig. C1. Schematisch overzicht van het systeem. A: reactor voor de productie van biosurfactants; B: grondwaterzuiveringsreactor; C: olie/waterscheider; D: buffertank.

Er wordt per week 2 m³ biosurfactantoplossing geproduceerd; de totale hoeveelheid onttrokken vloeistof in die periode is 1680 m³. Bij een olieconcentratie van 20 mg/L in de onttrokken vloeistof wordt daarmee dus circa 42 L olie geëmulgeerd (het soortelijk gewicht van de olie is ca. 0,8 kg/L). Dit betekent dat er circa 95 producties nodig zijn om de totale hoeveelheid aanwezige olie te emulgeren. Hiermee komt de duur van de in situ behandeling op circa 2 jaar.

Kosten

De extra kosten voor de productie van biosurfactants en infiltratie zullen globaal bestaan uit:

- investering: 2 reactorvaten, kleppen, leidingen:	= f	40.000
- installatie; circa 4 mandagen	= f	4.000
- bedrijfsvoering en onderhoud;	- circa 1 uur per week, 100 weken	= f 7.000
	- 2240 L zonnebloemolie	= f 3.000
	- nutriënten	= f 1.000
	- energie	= f 2.000

De extra kosten zullen dus in dit geval naar schatting f 50.000 tot f 60.000 bedragen, waarvan het grootste gedeelte bestaat uit investeringskosten. Hiertegenover staat een kostenbesparing door een verkorting van de benodigde grondwaterbeheersing. Het kostenaspect zal moeten worden afgewogen tegen het te behalen milieurendement en de risicoreductie.