

NOBIS 96025
PAK-AFBRAAK IN VERONTREINIGDE GROND
EN SEDIMENT MET WITROTSCHIMMELS

dr.ir. M.J.J. Kotterman (Landbouwniversiteit Wageningen)
dr.ir. J.T.C. Grotenhuis (Landbouwniversiteit Wageningen)

september 1999

Gouda, CUR/NOBIS

Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-situ Sanering

Auteursrechten

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze opgave 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 enige 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, "©"PAK-afbraak in verontreinigde grond en sediment met witrotschimmels", september 1999, 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, "©"Degradation of PAH in soil and sediment by white rot fungi", September 1999, 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

PAK-afbraak in verontreinigde grond en sediment met witrotschimmels

CUR/NOBIS rapportnummer

96025

Project rapportnummer

96025

Auteur(s)

dr.ir. M.J.J. Kotterman
dr.ir. J.T.C. Grotenhuis

Aantal bladzijden

Rapport: 18
Bijlagen: 4

Uitvoerende organisatie(s) (Consortium)

Landbouwniversiteit Wageningen, Departement Agro-, Milieu- en Systeemtechnologie, Sectie Milieutechnologie (dr.ir. J.T.C. Grotenhuis, 0317-482561)

Uitgever

CUR/NOBIS, Gouda

Samenvatting

In dit onderzoek is het effect van de witrotschimmels *Bjerkandera* sp. strain BOS55 en *Pleurotus ostreatus* op de afbraak van PAK's in grond onderzocht. De overleving van witrotschimmels hangt sterk af van de schimmelsoort en grond die wordt gebruikt. Ook actieve witrotschimmels kunnen met hun extracellulaire enzymen niet meer PAK's, gemeten als de som van de 10 VROM PAK's, afbreken in grond dan de endogene populatie. *P. ostreatus* kan de 5- en 6-rings PAK's wel veel sneller afbreken dan de endogene populatie. Dit positieve effect wordt echter gereduceerd door een verminderde afbraak van de 3-4-rings PAK's. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het sterk antibiotische effect van deze schimmel op de endogene PAK-afbrekende populatie.

Trefwoorden**Gecontroleerde termen:**

biologische afbraak, micro-organismen, milieuverontreiniging, PAK, schimmels

Vrije trefwoorden:

biobeschikbaarheid, grond, restconcentraties, witrotschimmel

Titel project

PAK-afbraak in verontreinigde grond en sediment met witrotschimmels (dr.ir. J.T.C. Grotenhuis, 0317-482561)

Projectleiding

Landbouwniversiteit Wageningen (dr.ir. J.T.C. Grotenhuis, 0317-482561)

Dit rapport is verkrijgbaar bij:

CUR/NOBIS, Postbus 420, 2800 AK Gouda

Report title
Degradation of PAH in soil and sediment
by white rot fungi

CUR/NOBIS report number
96025

Project report number
96025

Author(s)
dr.ir. M.J.J. Kotterman
dr.ir. J.T.C. Grotenhuis

Number of pages
Report: 18
Appendices: 4

Executive organisation(s) (Consortium)

Wageningen Agricultural University, Department of Agricultural, Environmental and Systems Technology,
Sub-department of Environmental Technology (dr.ir. J.T.C. Grotenhuis, 0317-482561)

Publisher

CUR/NOBIS, Gouda

Abstract

This project investigated the effect of white rot fungi on the degradation of PAH in polluted soils. The survival of the fungi strongly depends on both the type of fungus and the type of soil used. Active white rot fungi do not degrade more PAH, measured as the sum of the 10 VROM PAH, with their extracellular enzyme system than the indigenous microflora. *P. ostreatus* does degrade 5 and 6 rings PAH more rapidly than the indigenous microflora. This positive effect is counteracted by a decreased degradation of 3-4 ring PAH. This is caused probably by the antibiotic effect of this fungus on the indigenous, PAH-degrading microflora.

Keywords

Controlled terms:

biological degradation, environmental pollution,
fungi, micro-organisms, PAH

Uncontrolled terms:

bioavailability, residual concentrations,
soil, white rot fungi

Project title

Degradation of PAH in soil and sediment
by white rot fungi
482561)

Projectmanagement

Wageningen Agricultural University
(dr.ir. J.T.C. Grotenhuis, 0317-

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

VOORWOORD

Dit project is een aanvulling op het NOBIS-project 96-1-08 'Biodegradation of microcontaminants with fungal technology'. Omdat de biologische afbraak van verschillende organische verbindingen (PAK's, PCB's) in grond erg langzaam verloopt, en er vaak hoge restconcentraties achterblijven, is onderzocht of witrotschimmels de afbraaksnelheid kunnen verhogen. Witrotschimmels hebben een uniek extracellulair enzymstelsel dat aromatische structuren snel kan oxideren. Met de toepassing van deze schimmels zou misschien zowel de afbraaksnelheid als de totale afname van PAK kunnen toenemen. In dit onderzoek zijn twee witrotschimmels gebruikt; *Bjerkandera* sp. strain BOS55, die in gecontroleerde laboratoriumcondities PAK's zeer snel oxideert en detoxificeert, en *Pleurotus ostreatus*, die in literatuurrapporten ook als een goede PAK-afbreker en als een goede overlever in niet-steriele grond wordt beschreven. Beide schimmels zijn toegevoegd aan twee soorten grond. Het effect van de schimmels op de afbraaksnelheid en de mate van afbraak van totaal-PAK alsmede het effect op de afbraak van individuele PAK is onderzocht. De afbraak van PAK door de schimmels is vergeleken met de afbraak door de endogene microbiologische populatie

september 1999

INHOUD

		SAMENVATTING	v
		SUMMARY	vi
Hoofdstuk	1	INLEIDING	1
Hoofdstuk	2	MATERIALEN EN METHODEN	3
	2.1	Algemene proefopzet	3
	2.2	Entmateriaal	3
	2.3	Cosubstraat	3
	2.4	Grond	3
	2.5	PAK-analyse	4
	2.6	Metingen van de enzymactiviteit	4
	2.7	Metabole activiteit	4
Hoofdstuk	3	RESULTATEN EN DISCUSSIE	5
	3.1	Voorspelbaarheid van de afbraak van PAK's in grond	5
	3.2	Afbraak van PAK's in slib uit de petroleumhaven	6
	3.3	GFT-grond	10
Hoofdstuk	4	CONCLUSIES	11
Hoofdstuk	5	EVALUATIE VAN HET ONDERZOEK VAN DE NOBIS-PROJECTEN 96-1-08 EN 96025	12
		LITERATUUR	15
Bijlage	A	MEDIA VOOR AGARPLATEN	
Bijlage	B	ENZYMMETINGEN	
Bijlage	C	PAK-ANALYSE	
Bijlage	D	CO ₂ - EN O ₂ -BEPALING MET GASCHROMATOOGRAAF	

SAMENVATTING

PAK-afbraak in verontreinigde grond en sediment met witrotschimmels

Twee PAK-vervuilde gronden, die eerder onderzocht zijn in het kader van NOBIS-project 96-1-08 'Biodegradation of microcontaminants with fungal technology', zijn onderzocht met de witrotschimmels *Bjerkandera* sp. strain BOS55 en *Pleurotus ostreatus*. In NOBIS-project 96-1-08 is geconcludeerd dat de (witrot)schimmels *Agaricus bisporus* en *Pleurotus ostreatus* niet leiden tot een betere afbraak van PAK's in de bodem, terwijl in voorgaand onderzoek aan de Sectie Milieutechnologie wel degelijk verbetering van de afbraak van PAK's met de witrotschimmel *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in PAK-verontreinigde grond is aangetoond. De afbraak van PAK's in dezelfde twee gronden is nogmaals onderzocht onder omstandigheden waarbij witrotschimmels actief zijn. Tevens is onderzoek verricht naar de biobeschikbaarheid van PAK's in beide gronden.

De grond afkomstig van de petroleumhaven, die drie jaar is gerijpt bij de Kreekraksluizen, vormt een goed milieu voor de witrotschimmels. *P. ostreatus* doorgroeit de grond volledig en gedurende de 8 weken incubatie zijn hoge titers van de specifieke extracellulaire witrotschimmelenzymen (mangaan peroxidase en laccase) gemeten. *Bjerkandera* sp. strain BOS55 koloniseert de grond aanzienlijk minder en is slechts 6 weken actief aanwezig in de grond. Verrassenderwijs voltrekt de afbraak van PAK's zich het snelst in de grond zonder toevoeging van actief schimmel-inoculum of geautoclaveerd inoculum. Blijkbaar is er in deze grond een microbiologische populatie aanwezig met hoge PAK-afbrekende activiteit. Het toevoegen van geautoclaveerd inoculum of actief schimmel-inoculum heeft een klein negatief effect op de initiële afbraaksnelheid van PAK's, maar na 8 weken zijn de restconcentraties PAK's gelijk in de bacteriële controles (met of zonder toevoeging van geautoclaveerd inoculum) en in de schimmel behandelde grond (54 % afgebroken). De afbraak van 5- en 6-rings PAK's is wel verhoogd in aanwezigheid van de witrotschimmel *P. ostreatus*, maar dit is tenietgedaan door een verminderde afbraak van fluorantheen en pyreen. Het toevoegen van de schimmels heeft daarom geen effect op de hoogte van de eindconcentraties, gemeten als de som van de 10 VROM PAK's.

De grond afkomstig van een gasfabrieksterrein is voor beide schimmels een slecht milieu. Dit blijkt uit zowel de snel afnemende metabole activiteit (CO₂-productiesnelheid) als afnemende titers van de specifieke extracellulaire schimmelenzymen. Na een maand is er geen activiteit van de schimmels meer detecteerbaar. Ook voor andere micro-organismen is deze grond een slecht milieu. Er treedt nauwelijks afbraak van PAK's op (4 %) in zowel de grond met schimmel als in de grond met alleen endogene microbiologische activiteit.

De biologische beschikbaarheid van PAK's bepaalt de hoogte van de restconcentratie. Om voorafgaand aan de biologische afbraak de eindconcentraties te kunnen bepalen, is een partitiële extractie van de PAK's uitgevoerd. De uitgevoerde partitiële extractie met aceton blijkt te leiden tot een onderschatting van de biobeschikbare fractie.

SUMMARY

Degradation of PAH in soil and sediment by white rot fungi

Two PAH contaminated soils, previously investigated in NOBIS project 96-1-08 'Biodegradation of micropollutants with fungal technology', have been treated with the white rot fungi *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and *Pleurotus ostreatus*. The conclusion of NOBIS project 96-1-08 was that (white rot) fungi do not increase PAH degradation in PAH polluted soils, while previous research at the Sub-department of Environmental Technology did show an increased PAH removal by the use of white rot fungi. The PAH removal in these two soils as result of active white rot fungi is monitored again in this report. The bioavailability of PAHs in these two soils is also monitored.

The soil from the Petrol Harbour, ripened for three years at the Kreekraksluizen, was a good environment for both fungi. *P. ostreatus* completely colonised the soil and during the 8 weeks incubation period, high activity of the extracellular white rot fungal enzymes (manganese peroxidase and laccase) was observed. *Bjerkandera* sp. strain BOS55 colonised the soil to a lesser extent and extracellular enzyme activity was observed for a maximum of only 6 weeks. Surprisingly, the degradation of PAH was the highest in the soils without active fungal inoculum of autoclaved inoculum (biotic control). Apparently, a microbial population with high PAH degrading activity was present in this soil. The addition of the fungal inoculum (active either autoclaved) had a small negative effect on the initial PAH degradation rate, after 8 weeks the residual concentrations of PAH were equal in all treatments (54 % breakdown). The addition of active fungi had no effect on the residual PAH concentration, measured as the sum of the 10 VROM PAH. Five and six rings PAH were degraded to a higher extent by *P. ostreatus*, but this was counteracted by a decreased degradation of 3 and 4 ring PAH.

The soil from a old gasification site was for both the fungi not a suited environment. Both the metabolic activity (measured as CO₂) and the extracellular enzyme activity decreased rapidly upon addition to this soil. After one month, no activity of the fungi could be detected anymore. This soil was for other micro-organisms a bad environment as well, very low metabolic activity was observed in the soil itself. Almost no PAH degradation (4 %) was observed in the soils with or without supplementation with fungi.

The biological availability of PAH determines the extent of PAH degradation. In order to predict the extent of PAH degradation, a partial extraction of PAH has been performed. This extraction method appeared to underestimate the amount of bioavailable PAH.

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

De belangstelling voor het gebruik van witrotschimmels in de bodemsanering is gebaseerd op het unieke extracellulaire enzymstelsel van witrotschimmels dat het complexe, driedimensionale aromatische polymeer lignine kan afbreken [18]. Dit enzymstelsel (met peroxidases als lignine peroxidase, mangaan peroxidase, en mangaan onafhankelijk peroxidase en fenoloxidasen, als laccases) oxideert specifiek aromatische structuren van lignine, maar ook andere chemisch verwante structuren kunnen worden afgebroken door deze enzymen [1, 9, 13]. Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) zijn hiervan het interessantste voorbeeld.

Bij microbiologische sanering van PAK-vervuilde grond blijft de restconcentratie PAK's in de grond vaak boven de norm. De belangrijkste reden voor de slechte afbraak is, naast de chemische structuur, de lage biologische beschikbaarheid van de PAK's [25, 31, 33]. De lage biobeschikbaarheid van PAK's, veroorzaakt door de zeer lage wateroplosbaarheid, wordt in grond nog meer verlaagd door adsorptieprocessen van PAK's aan bodemdeeltjes [23, 27]. Afbraak van PAK's door de extracellulaire enzymen van witrotschimmels biedt interessante mogelijkheden, omdat de oxidatie van de PAK's buiten de cel door de extracellulaire enzymen plaatsvindt. Hierdoor zou de langzame diffusie van PAK's naar en in de bacteriële cel kunnen worden ontlopen. Een interessant detail hierbij is dat juist de hogere PAK's met extreem lage biobeschikbaarheid (zoals benzo[a]pyreen) goede substraten zijn voor de extracellulaire enzymen van witrotschimmels [6, 12, 29]. Zoals is weergegeven in tabel 1 neemt in het algemeen de oplosbaarheid van PAK's af (en daarmee de afbraaksnelheid door bacteriën) met oplopende grootte. De Ionisatie Potentiaal (IP) neemt gemiddeld genomen ook af met oplopende PAK-grootte [32]. Deze IP is een maat voor de hoeveelheid energie die nodig is om uit de PAK één elektron te verwijderen (oxideren). Door de oxidatiekracht van de ligninolytische enzymen zijn vooral de PAK's met een IP van 7,5 eV en lager goede substraten voor de één-elektron oxidatie door de extracellulaire enzymen van de witrotschimmel. PAK's met hogere IP kunnen ook wel door de witrotschimmelenzymen worden afgebroken, maar alleen in de aanwezigheid van specifieke cofactoren [4, 26, 29]. De IP heeft weinig of geen effect op de afbraaksnelheid van PAK's door de intracellulaire enzymen van micro-organismen; de afbraaksnelheid wordt voornamelijk bepaald door de biobeschikbaarheid. Omdat de afbraak van hoogmoleculaire PAK's met erg lage biobeschikbaarheid slechts heel langzaam verloopt, levert deze afbraak de micro-organismen nauwelijks voldoende energie. Deze PAK's worden daarom vaak slechts in de aanwezigheid van een beter afbreekbaar substraat afgebroken [16, 17].

Tabel 1. Oplosbaarheid in water en IP van verschillende PAK's.

PAK	oplosbaarheid ($\mu\text{g/l}$)	IP (eV)
naftaleen	30.000	8,2
fenanthreen	1.300	8,2
fluorantheen	260	7,8
benzo[a]anthraceen	14	7,5
benzo[a]pyreen	3,8	7,2
benzo[ghi]peryleen	2,6	7,3

Hoewel sommige PAK's door witrotschimmels zeer snel kunnen worden geoxideerd, leidt dit slechts echter tot beperkte mineralisatie (CO_2 -vorming) en voornamelijk tot ophoping van polaire PAK-metabolieten [2, 3, 21, 30]. Geaccumuleerde benzo[a]pyreenmetabolieten zijn, in tegenstel-

ling tot benzo[a]pyreen zelf, echter niet kankerverwekkend [21]. Daarnaast is aangetoond dat door de witrotschimmel geproduceerde benzo[a]pyreenmetabolieten gemakkelijker en sneller worden gemineraliseerd door bacteriën dan de oorspronkelijke PAK [21, 24]. Dit effect is ook bij andere PAK's en andere witrotschimmels waargenomen [5, 15, 28].

Witrotschimmels zijn inmiddels ook getest op de afbraak van PAK's in grond. In verschillende experimenten is aangetoond dat witrotschimmels in kunstmatig met PAK-vervuilde grond hoge afbraaksnelheden van PAK's kunnen bereiken [10]. Ook in praktijk verontreinigde grond zijn verhoogde afbraaksnelheden aangetoond [7, 11, 22], maar het effect op verlaging van de restconcentraties is niet groot.

Doel van dit onderzoek

In dit project is het effect van witrotschimmels op de afbraak van PAK's in twee verschillende PAK-verontreinigde gronden onderzocht. Onder omstandigheden waarvan bekend is dat de ligninolytische schimmels actief zijn is de afbraak van PAKs vergeleken met de afbraak van PAK's door de endogene microflora. Tevens is onderzocht of het rendement van de biologische afbraak kan worden gemeten met een snelle fysische test.

HOOFDSTUK 2

MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Algemene proefopzet

In dit onderzoek is de schimmel eerst voorgekweekt op een cosubstraat. Het cosubstraat levert de schimmel een energie- en koolstofbron dat niet of nauwelijks door andere micro-organismen kan worden gebruikt.

Na volledige begroeiing van het cosubstraat is de schimmel met de te onderzoeken grond gemengd en het watergehalte is geregeld.

Gedurende de incubatie in het donker bij 20 °C is de afbraak van PAK's gemeten, alsmede de CO₂-productie (maat voor de groei), de peroxidaseproductie en de pH.

In elke proef zijn abiotische en biotische controles meegenomen ter controle van de afbraak van PAK's door respectievelijk abiotische processen en de endogene microflora. De abiotische controle ('dood') bestaat uit grond met Na-azide (5 g kg⁻¹, remt aërobe micro-organismen) en geautoclaveerd beschimmeld cosubstraat. De eerste biotische controle ('bacteriële controle') bestaat uit grond met geautoclaveerd beschimmeld cosubstraat. De tweede biotische controle ('grond') bestaat uit alleen de grond zonder enige toevoeging.

2.2 Entmateriaal

In dit onderzoek is met *Bjerkandera* sp. strain BOS55 en met *Pleurotus ostreatus* gewerkt. BOS55 komt uit de cultuurcollectie van Industriële Microbiologie (LUW) [8] en *P. ostreatus* is geïsoleerd uit een commercieel gekweekte oesterzwam. Beide schimmels zijn bewaard bij 5 - 10 °C op gistextract/pepton agar (zie bijlage A). Maltextractplaten (zie bijlage A) zijn 5 - 8 dagen voor het inzetten van een proef beënt met de schimmel. Van de begroeide plaat zijn met een pons entplugs (± 5 mm) gestoken, 5 agarplugs zijn aan het cosubstraat toegevoegd onder steriele omstandigheden.

2.3 Cosubstraat

Het cosubstraat, hennep houtpijp, is gedurende 1 uur bij 121 °C gesteriliseerd. Na het beënten zijn de flessen met 8 g cosubstraat 4 weken voorgekweekt bij 20 °C.

2.4 Grond

In dit onderzoek zijn twee PAK-vervuilde gronden gebruikt. De eerste grond is slib uit de petroleumhaven Amsterdam dat al drie jaar is gerijpt bij de Kreekraksluizen. De tweede grond is afkomstig van een gasfabrieksterrein uit Stadskanaal (GFT). De gronden zijn eerst luchtgedroogd en gezeefd over een 2 mm zeef. Bij het mengen van de grond met het schimmelbegroeide cosubstraat wordt water toegevoegd om een goede vochtigheid te verkrijgen. In totaal zit er in een mengsel 40 g grond, 8 g cosubstraat, 18 ml water (uit cosubstraat) + 8 ml water (extra toegevoegd). Er zijn geen buffers of nutriënten toegevoegd. Tijdens de incubatie is het vochtverlies gemeten door weging van de flessen, indien nodig is het vochtgehalte aangevuld met demiwater.

2.5 PAK-analyse

Voor elk monsterpunt zijn 3 flessen in zijn geheel geanalyseerd. Voor de volledige extractie van de PAK's is een verhouding aceton/water van 80:20 (v/v) gebruikt, met een verhouding vloeistof/grond van 4:1 (v/w). Dit monster is dan vervolgens 15 minuten geplaatst in een ultrasoon trilbad en daarna een uur geschud op een schudbak (140 rpm). Monsters zijn 10 minuten bij 10.000 rpm in een eppendorfcentrifuge gecentrifugeerd, helder supernatant is overgebracht in een HPLC-vial. De gemeten PAK's zijn de 10 van VROM, alleen naftaleen is vervangen door pyreen.

De PAK's zijn ingedeeld in 3-rings PAK's: fenanthreen en anthraceen; 4-rings PAK's: fluorantheen, pyreen, benzo[a]anthraceen en chryseen; 5-rings PAK's: benzo[k]fluorantheen en benzo[a]pyreen; 6-rings PAK's: benzo[ghi]peryleen en indeno[123]pyreen.

Voor de partiële extractie van PAK's is 29:71 aceton/water (v/v) als extractiemiddel gebruikt, in een verhouding van 7,5:1 vloeistof/grond (v/w). De flessen zijn 2 uur End over End gemixt (20 rpm). De procedure is verder identiek aan de volledige extractie.

De PAK-concentratie is geanalyseerd met HPLC en een diode array detector, de precieze instellingen zijn opgenomen in bijlage C.

2.6 Metingen van de enzymactiviteit

Voor deze analyses is, net als bij de PAK-analyse, de hele inhoud van de flessen gebruikt. Aan elke fles is 100 ml demiwater toegevoegd waarna de fles gedurende een kwartier is geschud (140 rpm). Het waterig monster is gecentrifugeerd, de enzymactiviteiten in het supernatant zijn gemeten in een cuvet met behulp van een spectrofotometer. In de analyse wordt de veranderde lichtabsorptie bij een bepaalde golflengte, veroorzaakt door de oxidatie van een specifiek substraat door de ligninolytische enzymen, gemeten. Het substraat voor mangaan peroxidase (MnP) en mangaan onafhankelijk peroxidase (MIP) is dimethoxyphenol (DMP), voor laccase is dit ABTS. Het protocol is weergegeven in bijlage B.

2.7 Metabole activiteit

Als maat voor de metabole activiteit wordt de CO₂-productie gemeten met een gaschromatograaf. De flessen zijn hiervoor voorzien van een schroef dop met gat, waarin een rubber septum. Met een gasspuit is de gasfase in de fles geanalyseerd. Als ijk is een gasmengsel met een bekende hoeveelheid CO₂, O₂ en stikstof gebruikt (zie bijlage D).

RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Voorspelbaarheid van afbraak van PAK's in grond

In een voorgaand onderzoek aan de LUW (Milieutechnologie, niet gepubliceerd) blijkt er een redelijke relatie tussen de hoeveelheid extraheerbare PAK's (met een zwak extractiemiddel aceton/water 29:71) en de biologische afbreekbaarheid te bestaan. De hoeveelheid PAK's, die met deze partiële extractie kan worden geëxtraheerd uit de twee gronden, zou daarom een indicatie zijn voor de hoeveelheid PAK's die door de schimmel kan worden afgebroken.

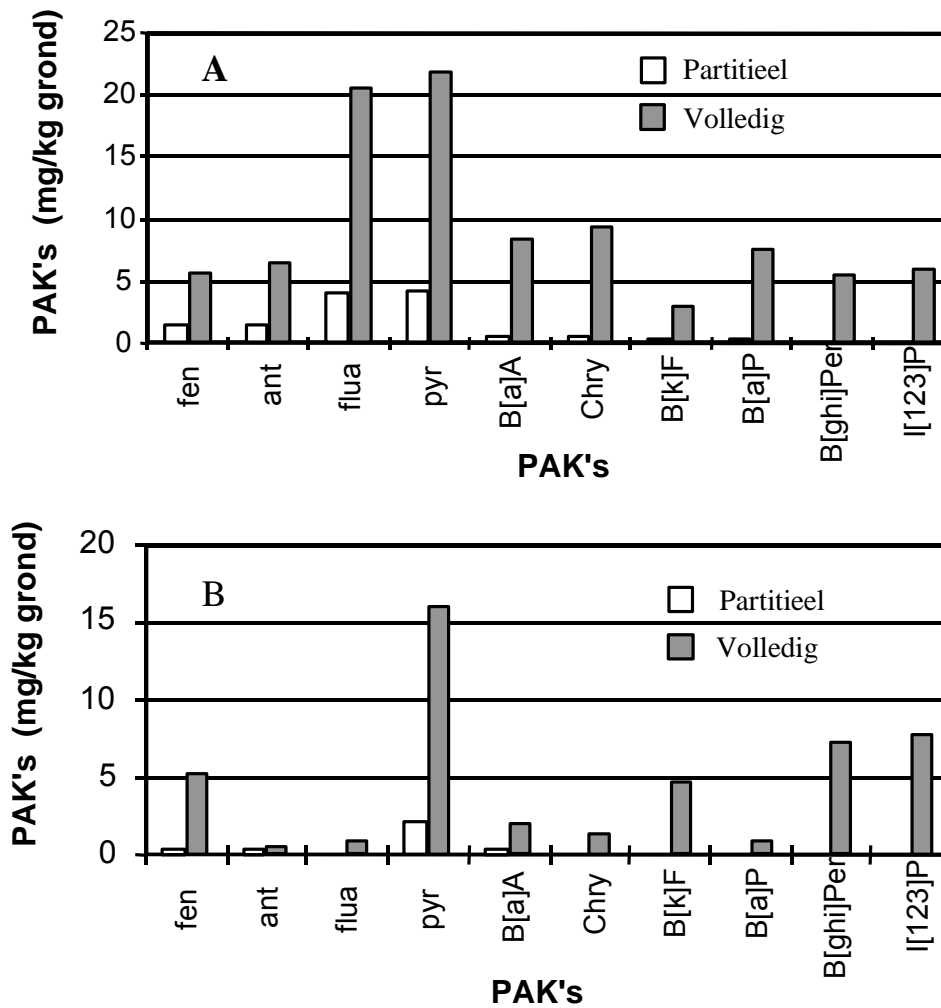


Fig. 1. Partiële en volledige extractie van slib uit de petroleumhaven (A) en GFT-grond (B).

Zoals is weergegeven in figuur 1A voor de 10 individuele PAK's, kan met de partiële extractie van slib uit de petroleumhaven 14 % van de totale hoeveelheid PAK's worden geëxtraheerd. Ook van sommige hoogmoleculaire PAK's is een klein percentage geëxtraheerd. Met de partiële extractie van de GFT-grond is slechts 4 % PAK geëxtraheerd. Deze resultaten suggereren dat slechts weinig tot bijna geen PAK's door de biologische behandeling kunnen worden afgebroken in deze laatste grond.

3.2 Afbraak van PAK's in slib uit de petroleumhaven

Het slib, dat reeds drie jaar is gerijpt bij de proefvelden bij de Kreekraksluizen, is een goed milieu voor de schimmel *P. ostreatus*. Deze doorgroeit snel de hele grond en is ook na 8 weken nog dominant aanwezig (vorming van paddestoelen). Er zijn hoge enzymtiters (laccase en mangaan peroxidase) gemeten gedurende de hele incubatieperiode. De enzymactiviteit van laccase varieert tussen 126 en 250 nmol/ml.min gedurende het hele experiment. De enzymactiviteit van mangaan peroxidase varieert tussen 620 en 575 nmol/ml.min.

De metabole activiteit van de schimmel is hoog, de CO₂-productiesnelheid blijft gedurende het hele experiment veel hoger dan in de controles. Na 4 weken zijn de CO₂-productiesnelheden voor de schimmel, grond met geautoclaveerd cosubstraat en grond respectievelijk 2,5, 0,39 en 0,03 mmol CO₂/dag, de snelheid daalt hierna met 50 % tegen het eind van het experiment. Deze verhoogde CO₂-productiesnelheden tonen aan dat de schimmel actief lignine afbreekt (verhoogde metabole activiteit op de vrijgekomen cellulose). Een deel van het geautoclaveerde substraat is langzaam door de bodemorganismen afgebroken, de CO₂-productiesnelheid is aanzienlijk verhoogd vergeleken met de grond die niet voorzien is van geautoclaveerd cosubstraat.

Verder blijkt dat *P. ostreatus* ook in staat is om de bacteriële celcount, gemeten als kolonievormende units, in de grond te verlagen. Na 3 en na 6 weken is de hoeveelheid bacteriën gedaald tot respectievelijk 20 % en 7 %, vergeleken met de bacteriële controle. Daarbij verlaagt de schimmel de pH tot 5,9; de pH in de bacteriële controle is 7,3.

Bjerkandera sp. strain BOS55 doorgroeit de grond minder sterk dan *P. ostreatus* en vertoont ook een lagere enzymactiviteit. De enzymactiviteiten van mangaan peroxidase nemen af van 60 (na 2 weken) tot 10 nmol/min.ml na 4 weken. Na 6 weken is alleen in één monster van de triplo nog een lage enzymactiviteit waar te nemen. De enzymactiviteiten van mangaan onafhankelijk peroxidase nemen nog sneller af. Na 2 weken is de activiteit 32 nmol/ml.min, maar na 4 weken is geen activiteit meer te detecteren. Ook de CO₂-productiesnelheid neemt af van 0,73 mmol/dag (2 weken) naar waarden gelijk aan die van de bacteriële controle na 8 weken (0,32 mmol/dag).

Bjerkandera heeft geen negatief effect op de bacteriële celcount vergeleken met de bacteriële controle. De pH daalt slechts licht tot 6,8.

De initiële enzymactiviteiten zijn vergelijkbaar met de waarden uit de vloeistofculturen van *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Dit suggereert dat deze titers een groot effect op de afbraak van PAK's zouden kunnen hebben, omdat met deze titers zeer hoge afbraaksnelheden van PAK's zijn bereikt in de vloeistofculturen [19, 20].

Het effect op de afbraak van PAK's, zoals is weergegeven in figuur 2, is verrassend. Ondanks de hoge activiteit van de schimmels hebben deze in de eerste week een licht negatief effect op de afbraaksnelheid van PAK's. Ook de bacteriële controle vertoont een remming van de afbraaksnelheid van PAK's. Deze verschillen worden voornamelijk veroorzaakt door het grote verschil in de afbraaksnelheid van fluorantheen en pyreen; deze twee PAK's vormen een groot aandeel in de totale concentratie PAK's (zie fig. 1A). In grond zijn deze PAK's na 1 week al voor respectievelijk 53 % en 50 % afgebroken. Voor de bacteriële controle en *P. ostreatus* zijn de afbraakpercentages slechts respectievelijk 35 % en 36 %, en 26 % en 30 %. In de flessen met *Bjerkandera* treedt zeer weinig afbraak op van fluorantheen en pyreen, slechts 9 % van beide PAK's is afgebroken na een week.

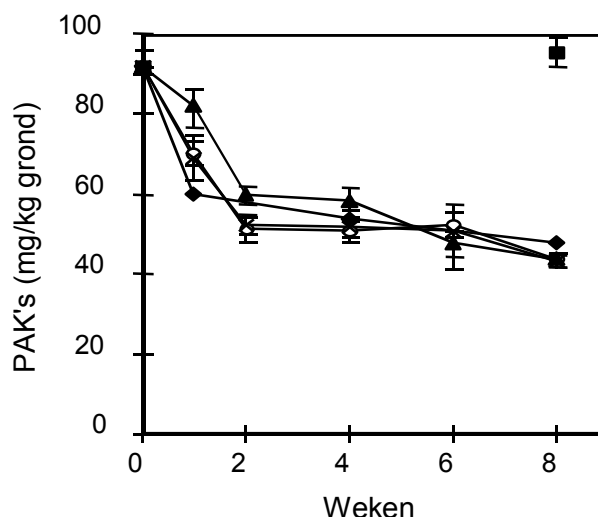


Fig. 2. Afbraak van PAK's in slib uit de petroleumhaven.

- Dode controle
- *P. ostreatus*
- ▲ *Bjerkandera sp. strain BOS55*
- * Bacteriële controle
- ◆ Grond

Na 8 weken zijn er in alle behandelingen vergelijkbare hoeveelheden PAK's afgebroken. Hoewel er dus geen significant effect van schimmelactiviteit op de hoogte van de eindconcentratie PAK's is, wordt de hoge ligninolytische activiteit van *P. ostreatus* wel weerspiegeld in de afbraak van specifiek de hoogmoleculaire PAK's. Zoals is weergegeven in tabel 2 worden de 5- en 6-rings PAK's beter afgebroken in aanwezigheid van *P. ostreatus*. Deze PAK's hebben een lage IP en zijn daarom relatief makkelijk te oxideren door de ligninolytische enzymen.

Tabel 2. Afbraak van 4-, 5- en 6-rings PAK's in de petroleumhaven na 8 weken incubatie, weergegeven als het percentage afgebroken ten opzichte van de dode controle. Standaarddeviaties zijn minder dan 5 % van de waarden (n = 3).

PAK	% afgebroken			
	<i>P. ostreatus</i>	<i>Bjerkandera sp. strain BOS55</i>	bacteriële controle	grond
fluorantheen	53	74	74	72
pyreen	72	82	82	81
benzo[a]pyreen	72	32	30	18
benzo[ghi]peryleen	41	6	4	0
indeno[123]pyreen	35	12	8	0

De 5- en 6-rings PAK's vormen doorgaans slechts een gering percentage van de totale hoeveelheid PAK's. De petroleumhaven is relatief sterk verrijkt met grote PAK's, maar toch bedragen de 5-6 rings PAK's uit tabel 2 niet meer dan 19 % van de 10 geanalyseerde PAK's. De 4-rings PAK's fluorantheen en pyreen, die wel een groot aandeel hebben in de totale hoeveelheid PAK's, worden door de endogene bacteriën juist beter afgebroken dan door *P. ostreatus*. Ook na 8 weken is het verschil in afbraak van deze PAK's tussen de bacteriën en *P. ostreatus* nog meetbaar. De relatief hoge IP's van 7,8 en 7,5 van fluorantheen en pyreen veroorzaken waarschijnlijk de slechte afbraak door de extracellulaire ligninolytische enzymen. De relatief 'hoge' oplosbaarheid van 120 µg/l en 140 µg/l van respectievelijk fluorantheen en pyreen is waarschijnlijk de

oorzaak van de goede afbraak door de endogene microbiologische populatie. De hoogmoleculaire PAK's (5 en 6 ringen) worden niet of nauwelijks afgebroken door bacteriën zonder de aanwezigheid van cosubstraat [16, 17]. De toegenomen afbraak van benzo[a]pyreen, benzo[ghi]peryleen en indeno[123]pyreen in de aanwezigheid van geautoclaveerd schimmelsubstraat in deze proef (zie bacteriële controle in tabel 2) suggereert dat dit dient als cosubstraat.

In figuur 3 zijn de resultaten uit figuur 2 en tabel 2 zodanig weergegeven dat de verschillen tussen de afbraak van PAK's door de bacteriën en de afbraak van PAK's door *P. ostreatus* duidelijk waarneembaar zijn. Door de preferente afbraak van 'laagmoleculaire' PAK's (met relatief hoge biobeschikbaarheid) door de endogene populatie en de preferente afbraak van hoogmoleculaire PAK's (met relatief lage IP) door *P. ostreatus* is er in de verdeling van niet-afgebroken PAK's een verschuiving waar te nemen. De grond bevat initieel een relatief groot aandeel 4-rings PAK's. Door de bacteriële activiteit worden vooral de 4-rings PAK's afgebroken, waardoor na 2 en 8 weken incubatie de concentraties 5- en 6-rings PAK's relatief toenemen ten opzichte van de initiële situatie. Als dit wordt vergeleken met *P. ostreatus* valt op dat ook de 5- en 6-rings PAK's goed worden afgebroken, zodat het aandeel 5- en 6-rings PAK's niet toeneemt. Na 8 weken incubatie is het effect van *P. ostreatus* op de afbraak van PAK's het meest duidelijk; hoewel de afname van de som van de PAK's gelijk is aan die in de bacteriële controle is de samenstelling van de resterende PAK's duidelijk verschillend van de bacteriële controle. In de grond met *Bjerkandera* is de afname in PAK-concentratie na twee weken aanzienlijk lager dan in de *P. ostreatus* of bacteriële controle. Het effect op de samenstelling van de PAK's ligt tussen de bacteriële controle en *P. ostreatus* in. Na 8 weken is er geen verschil tussen de afbraak van PAK's in de bacteriële controle en de grond waar *Bjerkandera* aan is toegevoegd.

Dat de toevoeging van *Bjerkandera* slechts resulteert in lagere afbraaksnelheden van PAK's zou veroorzaakt kunnen zijn door de remming van de hoge activiteit van de al aanwezige microbiële populatie. De schimmel heeft echter geen effect op de bacteriële celcounts. De kleine verschuiving in de verdeling van PAK's na 2 weken suggereert dat de schimmelenzymen de eerste weken wel actief zijn geweest. Zoals de enzymmetingen en CO₂-metingen al aantonen, neemt hierna de activiteit van de schimmel snel af. De eindconcentraties PAK's na 8 weken zijn dan ook identiek aan die van de bacteriële controle. Er moet worden opgemerkt dat de enzymactiviteiten, gemeten in de spectrofotometer, weinig zeggen over de activiteit van deze enzymen in grond. De waterstofperoxide-productiesnelheid, die in vloeistofculturen vaak beperkend is gebleken voor de activiteit van de peroxidases, limiteert misschien ook in de grond de activiteit van de hoge enzymtiteren. Aangezien *Bjerkandera* de grond minder goed doorgroeit dan *P. ostreatus* is de ligninolytische activiteit misschien voornamelijk geconcentreerd in de hennep houtpijp zelf, waardoor weinig PAK's in contact zijn gekomen met de ligninolytische enzymen.

Het maximale rendement van de afbraak van PAK's in de grond van de petroleumhaven (54 %) is hoger dan de waarde die is voorspeld bij de partitiële extractie (14 %). Ook de afbraak van individuele PAK's wijkt sterk af van de voorspelde waarde die is verkregen met de partitiële extractie. De gebruikte partitiële extractie met aceton blijkt bij deze grond niet bruikbaar om het maximale afbraakrendement te voorspellen.

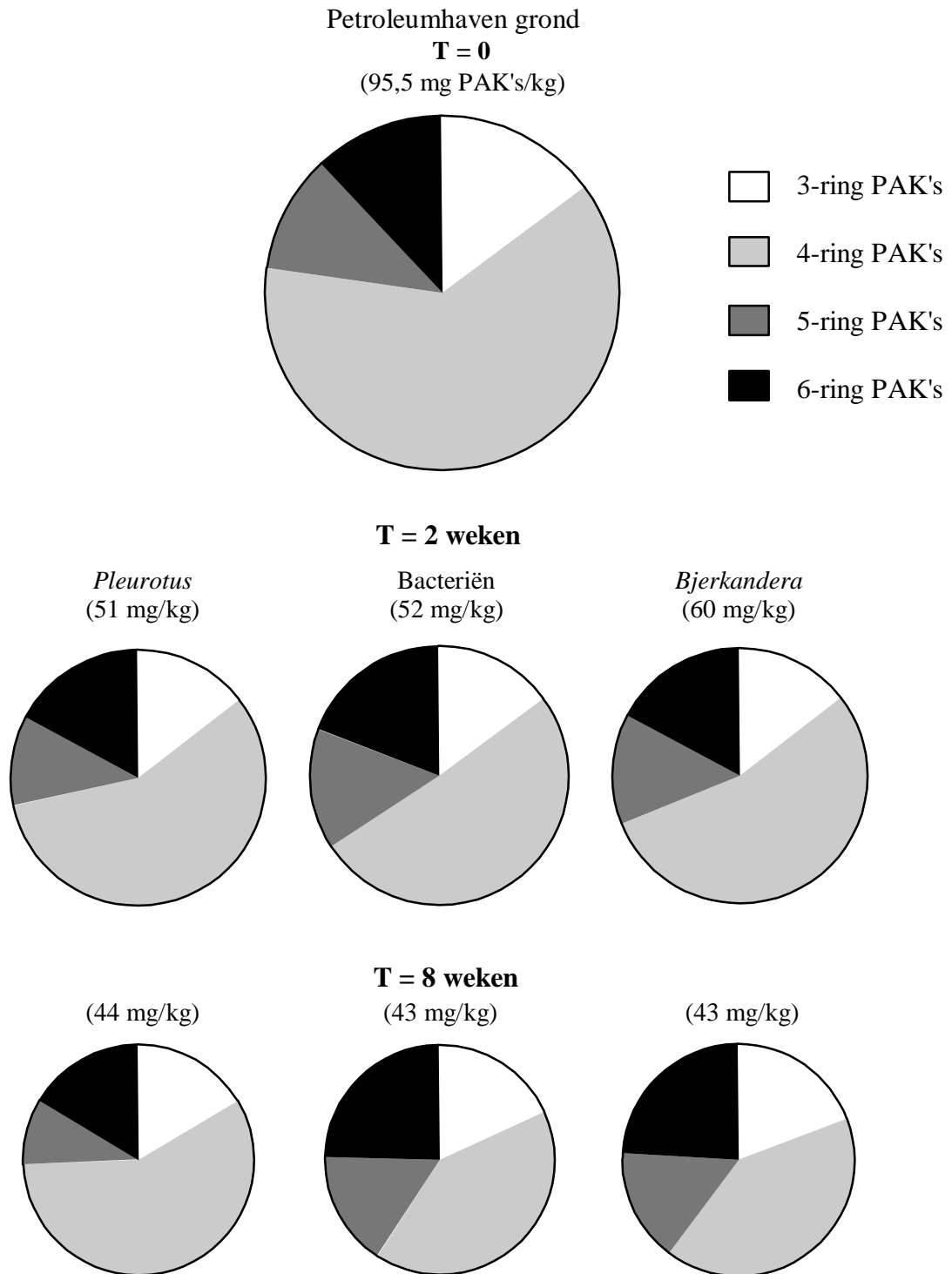


Fig. 3. Concentraties van de 10 VROM PAK's in grond van de petroleumhaven, onderverdeeld in grootteklassen, na 2 en 8 weken incubatie.

3.3 GFT-grond

Het tweede experiment is uitgevoerd met gasfabrieksterreingrond (GFT). Om de resultaten van de laboratoriumexperimenten te kunnen vertalen naar de te verwachten resultaten bij toepassing op grote schaal, is geen buffering van de grond uitgevoerd.

De GFT-grond blijkt echter een slechte omgeving voor de groei en activiteit van de schimmels. De enzymactiviteiten van *Bjerkandera* zijn initieel wel hoger dan in de grond van de petroleumhaven; na twee weken zijn de enzymactiviteiten 490 en 300 nmol/ml.min voor respectievelijk mangaan peroxidase en mangaan onafhankelijk peroxidase. Echter, de enzymactiviteit neemt daarna snel af; na vier weken is nauwelijks enige activiteit meetbaar. De enzymactiviteiten van *P. ostreatus* zijn in de GFT-grond lager dan in de grond van de petroleumhaven, slechts 25 en 71 nmol/ml.min voor respectievelijk mangaan peroxidase en laccase. Ook deze enzymactiviteiten zijn niet meer detecteerbaar na 4 weken.

De metabole activiteit van de schimmels, gemeten als CO₂-productiesnelheid, is de eerste weken nog aardig op peil en voor beide schimmels gelijk. Na drie weken is de activiteit van *Bjerkandera* iets hoger dan de *P. ostreatus*, maar het is minder dan drie keer hoger dan de bacteriële controle (respectievelijk 1,9, 1,8 en 0,7 mmol/dag). Hierna neemt de metabole activiteit echter snel af tot achtergrondwaarden (0,7 mmol/dag) na 6 weken. Opvallend is de zeer lage CO₂-productie in grond zonder geautoclaveerd cosubstraat (minder dan 0,01 mmol/dag).

De pH van de grond wordt door de schimmels wel verhoogd (pH 3,5 naar 5,7), maar met de afsterving van de schimmels zakt de pH weer naar pH 4,5.

In zowel de bacteriële controles als de schimmelcultures is een zeer beperkte afbraak van PAK's te meten. De PAK-concentratie neemt slechts 4 % af (van de initiële concentratie van 44 mg kg⁻¹) en er is geen enkel effect van de witrotschimmels meetbaar. De waarde van 4 % afbraak komt goed overeen met de voorspelde waarde uit de partiële extractie. De partiële extractie van de grond van de petroleumhaven is echter flink lager dan de uiteindelijke afbraak van PAK's. Voor het schatten van de biologische beschikbaarheid is inmiddels op de Sectie Milieutechnologie een andere methode ontwikkeld. Met deze methode wordt de biobeschikbare fractie PAK's in de GFT-grond gemeten als 40 % van de initiële concentratie (Cuijpers, mondelinge mededeling). Deze waarde komt goed overeen met de waarden van de afbraak van PAK's (≅ 40 %) in het eerdere NOBIS-onderzoek. Hieruit blijkt dat met de partiële extractie met aceton de hoeveelheid afbreekbare PAK's wordt onderschat. Deze resultaten impliceren wel dat de biologische activiteit in dit experiment beperkend is geweest. De grond remt blijkbaar de afbraak van PAK's door zowel de bacteriën als de schimmels.

HOOFDSTUK 4

CONCLUSIES

Uit het onderzoek met de PAK-vervuilde gronden van GFT en petroleumhaven blijkt dat door toepassing van witrotschimmels noch de afbraaksnelheid van totaal-PAK noch de mate van afbraak van totaal-PAK toeneemt in vergelijking met de bacteriële controles. De extracellulaire ligninolytische enzymen van de witrotschimmels zijn blijkbaar niet in staat om significant meer PAK's af te breken dan de aanwezige bacteriële populatie. De lage biologische beschikbaarheid van de restfractie PAK's is voor de extracellulaire enzymen van de witrotschimmel een even grote barrière als voor de bacteriën. De extracellulaire enzymen van *P. ostreatus* zijn echter wel actief in de bodem. Dit blijkt uit de snellere afbraak van specifiek de 5- en 6-rings PAK's vergeleken met de bacteriële controles. Dit effect wordt echter tegengewerkt door de verminderde afbraak van de lagere PAK's in de aanwezigheid van *P. ostreatus*, waarschijnlijk veroorzaakt door de sterk antibiotische werking van deze schimmel jegens de endogene PAK-afbrekende microbiologische populatie.

De gebruikte extractiemethode met aceton geeft een onderschatting van de hoeveelheid PAK's die door een microbiologische sanering kan worden afgebroken.

De witrotschimmel *P. ostreatus*, indien toegevoegd aan de grond op een goed cosubstraat, kan zich uitstekend handhaven in niet-steriele grond. Het rendement van de witrotschimmeltechnologie ligt echter niet hoger dan die van de biologische afbraak door andere micro-organismen. De witrotschimmeltechniek zal daarom slechts zelden economisch haalbaar zijn. Alleen in grond met slechts weinig PAK-afbrekende micro-organismen en met een hoog gehalte aan hoog moleculaire PAK's (5-6 ringen) zou de witrotschimmel de afbraaksnelheid van PAK's sterk kunnen verhogen.

HOOFDSTUK 5

EVALUATIE VAN HET ONDERZOEK VAN DE NOBIS-PROJECTEN 96-1-08 EN 96025

De doelstelling van het onderzoek is de toepassing van de extracellulaire ligninolytische enzymen van witrotschimmels voor de afbraak van stoffen die door andere organismen niet, of slechts heel langzaam kunnen worden afgebroken in grond.

Theorie van de witrotschimmeltechnologie

De unieke eigenschappen van de witrotschimmels schuilen in het extracellulaire ligninolytische enzymstelsel. Dit systeem kan het complexe, aromatische polymeer lignine oxideren met een één-elektron oxidatie. Dit enzymstelsel heeft een bepaalde specificiteit, waardoor slechts sommige aromatische xenobioten goede substraten zijn van de specifieke extracellulaire enzymen. Of een bepaalde verbinding door ligninolytische enzymen kan worden geoxideerd hangt sterk af van de Ionisatie Potentiaal (IP); de hoeveelheid energie die nodig is voor een één-elektron oxidatie van de verbinding. De gemeten oxidatiekracht van de ligninolytische enzymen is het hoogst voor lignine peroxidase en neemt af in de reeks lignine peroxidase, mangaan peroxidase, laccase. De IP's van niet-aromatische verbindingen als HCH, of hooggechlorideerde aromaten als PCB's zijn zo hoog dat deze verbindingen op theoretische gronden niet of nauwelijks kunnen worden geoxideerd door deze enzymen. Ook lang niet alle PAK's zijn erg geschikte substraten, bijvoorbeeld fenantreen of fluorantheen hebben een hoge IP. In de aanwezigheid van bepaalde verbindingen (mediatoren) kunnen PAK's met hoge IP (b.v. fenanthreen) echter toch door ligninolytische enzymen zoals laccase worden afgebroken [4]. Daarnaast kan niet worden uitgesloten dat deze verbindingen wel intracellulair door de schimmel kunnen worden afgebroken.

In NOBIS-project 96025 is alleen de afbraak van PAK's door witrotschimmels bekeken. Deze groep van verbindingen lijkt namelijk de meest geschikte als target-compound voor witrotschimmeltechnologie. Maar ook bij deze groep verbindingen is witrotschimmeltechnologie niet zaligmakend. In tegenstelling tot wat het literatuuronderzoek van NOBIS-project 96-1-08 beweert, zijn PAK's met 4 of meer ringen niet resistent tegen bacteriële afbraak. Er is aangetoond dat 4- en 5-rings PAK's als enige koolstof en energiebron kunnen dienen voor bacteriën [14, 16, 34]. In de aanwezigheid van een geschikt cosubstraat kunnen zelfs 6-rings PAK's worden afgebroken [16, 17]. Witrotschimmels kunnen echter met de extracellulaire enzymen veel PAK's, waaronder beruchte carcinogene als de 5-rings PAK benzo[a]pyreen, zeer snel afbreken, waardoor de sanering van PAK-vervuilde gronden zou kunnen worden bespoedigd.

Uitvoering van de witrotschimmeltechnologie

Wanneer het effect van de unieke extracellulaire ligninolytische enzymen van witrotschimmels op de afbraak van verbindingen in de grond wordt bestudeerd, is de eerste vereiste dat deze ligninolytische enzymen aanwezig én actief zijn.

Er is enige onduidelijkheid of *Agaricus bisporus* een echte witrotter kan worden genoemd. In ieder geval is deze schimmel geen goede lignine-afbreker, maakt voornamelijk alleen laccases en staat niet bekend als een schimmel die de competitie met andere micro-organismen goed aankan. In het kader van dit onderzoek is het gebruik van *A. bisporus* wel goed te beargumenteren door de grote hoeveelheid die van deze schimmel beschikbaar is voor de schimmeltechnologie.

Om hoge schimmelactiviteiten te verkrijgen is het gebruik van oude schimmelkweken, zowel van *A. bisporus* als *P. ostreatus*, in grond niet aanbevelenswaardig. Grond is namelijk een vijandige omgeving voor witrotschimmels (niet de natuurlijke habitat) en de schimmels van oude kweken hebben nog maar weinig groei-kracht. In het geval van oude *Pleurotus*-kweken is het lignine van het gebruikte cosubstraat (stro) al zover afgebroken dat andere organismen ook de cellulose kunnen afbreken. Het gebruik van afgewerkt *P. ostreatus* substraat als veevoer onderstreept dit. De concurrentiepositie van de schimmel ten opzichte van endogene bodemorganismen is daarom slecht.

In NOBIS-project 96-1-08 is de overleving van zowel *A. bisporus* als *P. ostreatus* in verscheidene proeven erg slecht. Hoewel de overleving van *P. ostreatus* in de terrariumproeven goed lijkt, doorgroeit de schimmel de grond niet. De activiteit van de ligninolytische enzymen is helaas niet gemeten. In het veld overleeft *P. ostreatus* het evenmin als *A. bisporus*. In geen van de proeven is een extra effect van de schimmels op de afbraak van PAK's gemeten. Het gestoomde schimmelsubstraat zelf heeft wel een positief effect op de afbraak van PAK's. Overigens tonen de data van de afbraak van PAK's in het rapport aan dat hoog moleculaire PAK's ook in dit onderzoek wel degelijk worden afgebroken door de endogene microbiologische populatie.

In NOBIS-project 96-1-08 is de afbraak van HCH, DDT en dioxinen gemeten in kolomproeven. Ter controle van de schimmelactiviteit is de specifieke enzymactiviteit van zowel *A. bisporus* als *P. ostreatus* gemeten. Er is echter alleen laccase aangetroffen, ook bij incubaties boven de 30 °C, wat boven de temperatuurgrens van *P. ostreatus* ligt. Daarnaast wordt in de gestoomde controles meer laccase-activiteit gemeten dan in de schimmelincubaties. In het latere NOBIS-project 96025 zijn in proeven met *P. ostreatus* altijd simultaan hoge laccase- en MnP-activiteiten gemeten; in zowel 'vers' afgewerkt substraat van de kweker als na toevoeging van de schimmel op afgewerkt substraat of op houtsnippers aan grond. Dit alles toont aan dat de gemeten laccase-activiteit in de kolomproeven (NOBIS-project 96-1-08) in ieder geval geen specifieke *P. ostreatus*-activiteit is. In deze proeven is geen effect van de schimmels op de afbraak van PCB's, HCH, DDT en dioxinen waargenomen.

De overleving en activiteit van de twee schimmels is in deze proeven niet altijd overtuigend aangetoond. Uit de resultaten van deze proeven kunnen dus geen harde conclusies worden getrokken over het effect van *P. ostreatus* en *A. bisporus* op de afbraak van organische microverontreinigingen in grond.

In NOBIS-project 96025 zijn de witrotschimmels als een verse ent op hennep houtpijp (4 tot 6 weken oud) aan de bodem toegevoegd. De concurrentiepositie van de schimmels is op deze manier sterker; *Bjerkandera* sp. strain BOS55 houdt het 6 weken vol in grond van de petroleumhaven, terwijl de *P. ostreatus* zelfs in staat is de endogene populatie uit te schakelen en vruchtlichamen te vormen. De overleving van de schimmel en de activiteit van de ligninolytische enzymen is aangetoond door CO₂-productiesnelheden en enzymactiviteitsmetingen. In benchscale proeven (3 kilo grond) met slechts 10 % ent koloniseert *P. ostreatus* een creosootverontreinigde grond ook volledig. De endogene populatie is gedecimeerd (tot 0,1 %), de schimmel vormt vruchtlichamen en gedurende 4 maanden is een hoge *Pleurotus*-activiteit gemeten (onderzoek in opdracht van Ecotechniek).

Uit de proeven met grond van de petroleumhaven blijkt duidelijk dat de *P. ostreatus* een effect heeft op de samenstelling van de resterende PAK's. De witrotschimmel is in staat om 5- en 6-rings PAK's veel sneller te oxideren dan de endogene micro-organismen. Omdat de afbraaksnelheid van lagere PAK's juist wordt geremd in de aanwezigheid van schimmel (waarschijnlijk door de anti-microbiologische werking jegens de PAK-afbrekende endogene populatie) zijn de

eindconcentraties totaal-PAK echter niet lager dan in de grond met alleen endogene micro-organismen.

Slotconclusie

In het NOBIS-project 96-1-08 is geen effect van de schimmels op de afbraak van organische microverontreinigingen in grond gemeten. Aangezien er tijdens de experimenten geen duidelijke activiteit van de schimmels is aangetoond, kan echter niet worden geconcludeerd dat de schimmels geen effect kunnen hebben op de afbraak van organische microverontreinigingen in grond.

Uit het onderzoek van NOBIS-project 96025 blijkt duidelijk dat de witrotschimmels, afhankelijk van de soort schimmel en de grond, slecht tot heel goed kunnen overleven in grond. Het effect van actieve extracellulaire ligninolytische enzymen van *P. ostreatus* op de PAK-samenstelling is duidelijk meetbaar door de verhoogde afbraaksnelheid van 5- en 6-rings PAK's in vergelijking met de endogene PAK-afbrekende populatie. De eindconcentraties PAK's in grond worden echter nauwelijks beïnvloed door de aanwezigheid van een actieve witrotschimmel. De niet-biobeschikbaarheid van de niet-afgebroken PAK's is ook voor de extracellulaire enzymen een onoverkomelijke barrière.

LITERATUUR

1. Aust, S.D., 1990.
Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*.
Microbiol. Ecol. 20: 197-209.
2. Bezalel, L., Y. Hadar en C.E. Cerniglia, 1996a.
Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 292-295.
3. Bogan, B.W. en R.T. Lamar, 1996.
Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 1597-1603.
4. Bohmer, S., K. Messner en E. Srebotnik, 1998.
Oxidation of phenanthrene by a fungal oxidase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 244: 233-238.
5. Brodkorb, T.S. en R.L. Legge, 1992.
Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 3117-3121.
6. Collins, P.J.J., M.J.J. Kotterman, J.A. Field en A.D.W. Dobson, 1996.
Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccase from *Trametes versicolor*.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 4563-4567.
7. Davis, M.W., J.A. Glaser, J.W. Evans en R.T. Lamer, 1993.
Field evaluation of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil.
Environ. Sci. Technol. 27: 2572-2576.
8. Field, J.A., E. de Jong, G. Feijoo-Costa en J.A.M. de Bont, 1992.
Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 2219-2226.
9. Field, J.A., E. de Jong, G. Feijoo-Costa en J.A.M. de Bont, 1993.
Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics.
Trends Biotechnol. 11: 44-49.
10. Field, J.A., H. Feiken, A. Hage en M.J.J. Kotterman, 1995.
Application of a white rot fungus to biodegrade benzo[a]pyrene in soil.
In: R.E. Hinchee, J. Fredrickson and B.C. Alleman (ed), Bioaugmentation for site remediation, Batelle press, Columbus, Ohio, USA, pp. 165-171.

11. Field, J.A., J.T.A. Van Veldhoven, B. Weller, C. Soeter, R. Wasseveld, J.T.C. Grotenhuis en W. Rulkens, 1996.
Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in polluted soil by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55.
Proceedings of the Eight International Congress for Culture collections, Veldhoven, The Netherlands. R.A. Samsom, J.A Stalpers, D. van der Mei and A.H. Stouthamer (eds). pp 336-343.
12. Haemmerli, S.D., M.S.A. Leisola, D. Sanglard en A. Fiechter, 1986.
Oxidation of benzo[a]pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*: veratryl alcohol, and stability of ligninase.
J. Biol. Chem. 261: 6900-6903.
13. Hammel, K.E., B. Kalyanaraman en T.K. Kirk, 1986.
Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium*.
J. Biol. Chem. 261: 16948-16952.
14. Heitkamp, M.A., W. Franklin en C.E. Cerniglia, 1988.
Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium.
Appl. Environ. Microbiol. 54: 2549-2555.
15. In der Wiesche, C., R. Martens en F. Zadrazil, 1996.
Two-step degradation of pyrene by white-rot fungi and soil micro-organisms.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 653-659.
16. Juhasz, A.L., M.L. Britz en G.A. Stanley, 1997.
Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*.
J. Appl. Microbiol. 83: 189-198.
17. Kanaly, R., R. Bartha, S. Fogel en M. Findlay, 1997.
Biodegradation of [¹⁴C]benzo[a]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil.
Appl. Environ. Microbiol. 63: 4511-4515.
18. Kirk, T.K. en R.L. Farrell, 1987.
Enzymatic 'combustion': The microbial degradation of lignin.
Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.
19. Kotterman, M.J.J., R.A. Wasseveld en J.A. Field, 1996.
Hydrogen peroxide production as a limiting factor in xenobiotic compound oxidation nitrogen-sufficient cultures of *Bjerkandera* sp. strain BOS55 overproducing peroxidases.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 880-885.
20. Kotterman, M.J.J., H.J.Rietberg, A. Hage en J.A. Field, 1998.
Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants.
Biotechnol. Bioeng. 57: 220-227.

21. Kotterman, M.J.J., E.H. Vis en J.A. Field, 1998.
Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora.
Appl. Environ. Microbiol. 64: 2853-2858.
22. Lamar, R.T., M.W. Davis, D.D. Dietrich en J.A. Glaser, 1994.
Treatment of a pentachlorophenol- and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration.
Soil Biol. Biochem. 26: 1603-1611.
23. Luthy, R.G., G.R. Aiken, M.L. Brusseau, S.D. Cunningham, P.M. Gschwend, J.J. Pignatello, M. Reinhard, S.J. Traina, W.J. Weber en J.C. Westall, 1997.
Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents.
Environ. Science Technol. 31: 3341-3347.
24. Meulenbergh, R., H.H.M. Rijnaarts, H.J. Doddema en J.A. Field, 1997.
Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability.
FEMS Microbiol. Lett. 152: 45-49.
25. Mihelcic, J.R., R.R. Lueking, R.J. Mitzell en J.M. Stapleton, 1993.
Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals.
Biodegradation. 4: 141-153.
26. Moen, M.A. en K.E. Hammel, 1994.
Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus.
Appl. Environ. Microbiol. 60: 1956-1961.
27. Pignatello, J.J. en B. Xing, 1996.
Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles.
Environ. Science Technol. 30: 1-11.
28. Sack, U. en W. Fritsche, 1997.
Enhancement of pyrene mineralization in soil by wood-decaying fungi.
FEMS Microbiol. Ecology 22: 77-83.
29. Sack, U., M. Hofrichter en W. Fritsche, 1997.
Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*.
FEMS Microbiol. Lett. 152: 227-234.
30. Sanglard, D., S.A. Leisola en A. Fiechter, 1986.
Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*.
Enzyme Microb. Technol. 8: 209-212.
31. Stucki, G. en M. Alexander, 1987.
Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds.
Appl. Environ. Microbiol. 53: 292-297.

32. Vazquez-Duhalt, R., D.W.S. Westlake en P.M. Fedorak, 1994.
Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents.
Appl. Environ. Microbiol. 61: 1699-1705.
33. Volkering, F., A.M. Breure, A. Sterkenburg en J.G. van Andel, 1992.
Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 548-552.
34. Weissenfels, W.D., M. Beyer, J. Klein en H.J. Rehm, 1991.
Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 528-535.

BIJLAGE A

MEDIA VOOR AGARPLATEN

	Hoeveelheden per liter:	
Maltextractplaten:	3,5 g	maltextract
	5 g	glucose
	15 g	agar
Gist/pepton:	2 g	gistextract
	5 g	pepton
	20 g	glucose
	15 g	agar
Gist/glucose:	3,5 g	gistextract
	3,5 g	glucose
	15 g	agar

BIJLAGE B

ENZYMMETINGEN

MnP-meting

De oxidatie van DmP wordt gemeten bij 468 nm, de molaire extinctiecoëfficiënt is 40.600.

	Hoeveelheid (µl):	Concentratie in reactiemengsel:
Dimethoxyphenol	50	1 mM
Malonaatbuffer (pH 4,5)	200	50 mM
MnSO ₄	50	1 mM
Water + enzym	600	
H ₂ O ₂	100	0,4 mM

MIP-meting

Dimethoxyphenol	50	1 mM
Malonaatbuffer	200	50 mM
EDTA	100	1 mM
Water + enzym	550	
H ₂ O ₂	100	0,4 mM

Laccase-meting

De oxidatie van ABTS wordt gemeten bij 380 nm, de molaire extinctiecoëfficiënt is 36.000.

	Hoeveelheid (µl):	Concentratie in reactiemengsel:
ABTS	200	2 mM
Fosfaatbuffer (pH 5,7)	200	20 mM
Water/monster	600	

BIJLAGE C

PAK-ANALYSE

Kolom: Vydac 5 c18 Rev. phase (201TP54)
(250 x 4,6 mm L x ID)

Mobiele fase: Acetonitril/water

5 min:	50 % ACN
5 - 15 min:	50 % → 100 %
15 - 35 min:	100 %
35 - 40 min:	100 % → 50 %
40 - 50 min:	50 %

Flow rate: 1,0 ml/min

Temperatuur: 20 °C

Detector: photo diode array detector ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

Injectie volume: 20 μl

Interne standaard: Trifenyleen

BIJLAGE D

CO₂- EN O₂-BEPALING MET GASCHROMATOOGRAAF

Kolom: Teflon (1,5 m x 2 mm); Chromosorb 108, 60 - 80 mesh
Stele (1,2 m x 2 mm); Mol sieve 5A, 60 - 80 mesh
De kolommen lopen parallel, split circa 1:1

Mobiele fase: Helium; 45 ml/min

Temperatuur: Oven 40 °C
Detector 100 °C
Injector 110 °C

Detector: TCD

Injectievolume: 100 µl