

ON SITE PRODUCTIE VAN BIOSURFACTANTS BIJ IN SITU BIOLOGISCHE BODEMREINIGING

Fase I: Optimalisatie van biosurfactant-productie tijdens de afbraak van minerale olie door gemengde cultures

Penvoerder MTI Milieutechnologisch Instituut C.V., Nijmegen

Projectpartners HASKONING Ingenieurs- en Architectenbureau B.V., Nijmegen;

Van der Sluijs Tankopslag B.V., Geertruidenberg ;

Vakgroep Biochemie, Rijksuniversiteit Groningen, Groningen.

NOBIS projectnr. 95-1-09

Trefwoorden: in situ biologische bodemreiniging, minerale olie, biodegradatie,
biobeschikbaarheid, biosurfactants

Datum rapportage 23-09-1996

Opstellers F. Volkering (MTI Milieutechnologie)
W.H. Noordman (Vakgroep Biochemie, Rijksuniversiteit Groningen)

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 een zogenaamde smeerlaag 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". Voor u ligt het eindrapport van de eerste fase van het project.

Oktober 1996

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING	4
SUMMARY	5
NOTATIES	6
HOOFDSTUK 1 ALGEMENE INLEIDING	7
1.1 Probleemdefinitie	7
1.2 Toepassing van biosurfactants	7
1.3 Doelstelling en opzet	8
HOOFDSTUK 2 VALIDATIE VAN OLIE-ANALYSE IN GRONDWATERMONSTERS MET BIOSURFACTANTS	9
2.1 Inleiding	9
2.2 Materialen en methode	9
2.3 Resultaten en discussie	10
2.4 Conclusies	12
HOOFDSTUK 3. PRODUKTIE VAN BIOSURFACTANTS IN BATCH-EXPERIMENTEN	13
3.1 Inleiding	13
3.2 Materialen en methode	13
3.3 Resultaten en discussie	14
3.4 Conclusies	17
HOOFDSTUK 4 OPTIMALISATIE PRODUKTIE BIOSURFACTANTS IN REACTOR-EXPERIMENTEN	18
4.1 Inleiding	18
4.2 Materialen en methode	18
4.3 Resultaten en discussie	20
4.4 Conclusies	25
HOOFDSTUK 5 KARAKTERISERING VAN DE GEPRODUCEERDE BIOSURFACTANTS	26
5.1 Inleiding	26
5.2 Fractionering effluenten en isolatie biosurfactant	26
5.3 Karakterisering biosurfactant	31
5.4 Discussie en conclusies	33
HOOFDSTUK 6 ALGEMENE DISCUSSIE EN CONCLUSIES	35
LITERATUUR	38
BIJLAGE A: GEDETAILLEERDE RESULTATEN BATCH-EXPERIMENTEN	40

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 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.

Dit rapport beschrijft de resultaten van de eerste fase van het project, waarin de productie van biosurfactants tijdens de afbraak van minerale olie op laboratoriumschaal is geoptimaliseerd en waarin een eerste karakterisering van de geproduceerde biosurfactants is uitgevoerd.

In batch-experimenten is gevonden dat bij de afbraak van minerale olie (afkomstig van de verontreinigde site) door gemengde cultures, biosurfactant-productie optrad. Deze productie was grotendeels onafhankelijk van de stikstof- en fosfaat-concentratie. Het toevoegen van extra koolstofbronnen bleek slechts in het geval van glycerol en zonnebloemolie te leiden tot een verhoogde productie van biosurfactants.

Ook tijdens de continue afbraak van minerale olie in reactoren is productie van biosurfactants waargenomen, waarbij het toevoegen van zonnebloemolie leidde tot een significante verhoging van de biosurfactant-productie. De beste resultaten zijn echter gevonden wanneer de reactoren als fed batch werden bedreven. Op deze wijze is het mogelijk biosurfactant-oplossingen met een sterke emulgerende werking te produceren.

De aanwezigheid van rhamnolipide biosurfactants en van de door de mengcultures geproduceerde biosurfactants bleek de analyse van minerale olie in water te verstoren door de vorming van emulsies tijdens de extractie-stap. Deze verstoring kon worden opgeheven door eenvoudige voorbehandelingen (aanpassing van pH en toevoeging van NaCl) van de monsters.

Uit de karakterisering van de geproduceerde biosurfactants is gebleken dat de fractie van de reactor-effluenten waarin de emulgerende eigenschap aanwezig is, rijk is aan suikers en 40% D-glucose equivalenten bevat. De verbinding bevat weinig eiwit en met GC-MS analyse werden geen lipiden gevonden. Er is geconcludeerd dat het biosurfactant een polysaccharide is. Per liter effluent werd 1.2 gram van dit polysaccharide biosurfactant geïsoleerd; de emulgerende eigenschappen ervan zijn goed vergelijkbaar met die van commercieel verkrijgbare bio-emulsifiers.

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 mobilisation and biodegradation of the oil present as an NAPL.

This report presents the results of the first phase of the project, in which the production of biosurfactants during the biodegradation of mineral oil was optimized and in which a preliminary characterization of the biosurfactants was performed.

In batch experiments it was found that it was possible to produce biosurfactants during the biodegradation of mineral oil, originating from the polluted site. The biosurfactant production was relatively independent of the nitrogen and phosphorous concentration of the aqueous phase. The presence of several additional carbon sources was also investigated. Of the substrates tested, only the presence of glycerol and sunflower oil stimulated the biosurfactant production.

Biosurfactant production was also observed during the continuous biodegradation of mineral oil in reactors. The addition of sunflower oil resulted in a significant increase in the biosurfactant production. The best results, however, were found when the reactors were used in a fed-batch mode. This way, it was possible to produce biosurfactant solutions with a high emulsifying activity.

The presence of rhamnolipid biosurfactants and the biosurfactants produced in the reactor experiments lowered the recovery of mineral oil during the oil analysis. This effect was caused by the formation of emulsions during the extraction with hexane. For the rhamnolipid biosurfactant, the hexane emulsification could be prevented by acidification of the sample to a pH of 2 prior to extraction. For the biosurfactants produced in the reactor experiments, it was found that adjusting the pH of the sample to a value of 12 prevented hexane emulsification.

A first characterization of the biosurfactants showed that the fraction of the reactor-effluent causing the emulsifying activity consisted mainly of sugar components. No lipid compounds and only little peptides could be detected. It was concluded that the biosurfactant is a polysaccharide. It is produced in concentrations up to 1.2 g/L and its emulsifying properties are comparable to those of commercially available biosurfactants.

NOTATIES

CMC	Critical micelle concentration [g/L]
CMD	Critical micelle dilution [-]
E_{24}	Maat voor emulgerende werking [%]
EMA	Emulgerende activiteit [-]
HRT	Hydraulische retentietijd [h]
OD540	Optische dichtheid bij 540 nm [-]
: EMA	Microtiter emulgerende activiteit [AU]

HOOFDSTUK 1 ALGEMENE INLEIDING

1.1 Probleemdefinitie

Eén van de problemen bij biologische in situ bodemreiniging is de lage afbraaksnelheid van hydrofobe organische verontreinigingen, zoals PAKs, PCBs 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 bodem 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. Dit probleem wordt ook wel limitatie van biobeschikbaarheid genoemd en wordt algemeen als één van de belangrijke biologisch-technologische knelpunten bij de biologische bodemreiniging beschouwd.

1.2 Toepassing van biosurfactants

De meestgenoemde oplossing voor biobeschikbaarheids-problemen is het gebruik van oppervlakte-actieve stoffen (surfactants of tensiden). 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 surfactant moleculen;
- (ii) emulgering van vloeibare verontreinigingen;
- (iii) mobilisatie van verontreinigingen in de poriën van bodemdeeltjes door verlaging van de oppervlaktespanning (betere bevochtiging).

Wanneer, zoals in het geval van drijfvlagen van minerale olie, de verontreiniging aanwezig is als aparte vloeistof-fase (Engelse term: nonaqueous phase liquid of NAPL) zullen 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. 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 verbindingen zijn in staat zeer lage oppervlaktespanningen 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 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 dus voornamelijk veroorzaakt door mechanisme (ii). Voorbeelden van bio-emulsifiers zijn vetzuren, fosfolipiden, polypeptiden en polysacchariden.

Sterke productie van biosurfactants met goede oppervlakte-actieve eigenschappen gebeurt voornamelijk tijdens de groei van micro-organismen op goed afbreekbare koolstofbronnen onder limitatie van bv. stikstof, fosfaat of spore-elementen. Bio-emulsifiers worden vooral geproduceerd tijdens groei op slecht in water oplosbare vloeibare substraten zoals olie-achtige verbindingen [Desai & Desai 1993, Van Dyke *et al.* 1993].

1.3 Doelstelling en opzet

In de eerste fase van het project, waarvan hier gerapporteerd wordt, is in het laboratorium de productie van biosurfactants tijdens de afbraak van minerale olie onderzocht. Hoofd-doelstelling hierbij is het optimaliseren van de biosurfactant-productie tijdens afbraak van minerale olie die afkomstig is van het verontreinigde terrein. Om meer fundamenteel inzicht te krijgen in de microbiële fysiologie van de biosurfactant-productie en in de werking van de geproduceerde biosurfactants is een eerste karakterisering van de biosurfactants uitgevoerd.

Het onderzoek was verdeeld in vier deelfasen:

1. Validatie van de olie-analyse in de aanwezigheid van biosurfactants
2. Optimalisatie van biosurfactant-productie in batch-experimenten;
3. Optimalisatie van biosurfactant-productie in reactor-experimenten;
4. Karakterisering van de geproduceerde biosurfactants.

De uitvoering van de eerste drie onderdelen is gebeurd bij MTI Milieutechnologie Nijmegen, de karakterisering van de geproduceerde biosurfactants is uitgevoerd bij de vakgroep Biochemie van de Rijksuniversiteit Groningen. Ook in dit rapport zal de indeling in deelfasen worden aangehouden.

HOOFDSTUK 2 VALIDATIE VAN OLIE-ANALYSE IN GRONDWATERMONSTERS MET BIOSURFACTANTS

2.1 Inleiding

De aanwezigheid van oppervlakte-actieve en/of emulgerende stoffen, zoals biosurfactants, in waterige monsters kan bij de extractie van olie leiden tot vorming van emulsies. Hierdoor kan de analyse van olie in water tijdens de uitvoering van het project verstoord worden.

Om dit te testen zijn in dit projectonderdeel drie reeksen experimenten uitgevoerd. In de eerste reeks zijn "standaard" olie-analyses uitgevoerd op waterige monsters met en zonder rhamnolipide biosurfactants, waarvan het olie-gehalte vooraf bekend was. In de tweede reeks experimenten is met soortgelijke monsters de extractiemethode geoptimaliseerd, waarna de geoptimaliseerde extractiemethode is gecontroleerd met een nieuwe serie olie-analyses. De laatste serie is uitgevoerd met tijdens de reactor-experimenten geproduceerde biosurfactant-oplossingen (zie Hoofdstuk 4).

2.2 Materialen en methode

Rhamnolipide biosurfactants zijn geproduceerd door het kweken van *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 in mineraal medium op basis van grondwater met 5% glucose en 1% proteose pepton. Na 1 week incubatie bij 25°C is de cultuurvloeistof gecentrifugeerd en het supernatant is gebruikt als rhamnolipide biosurfactant-mengsel. De oppervlaktespanning van het supernatant was 30 mN/m; de CMD was ca. 4. De productie van de biosurfactants met behulp van een gemengde, olie-afbrekende culture (polysaccharide biosurfactants) staat beschreven in Hoofdstuk 4.

Bij de eerste serie experimenten zijn aan het rhamnolipide biosurfactant-mengsel en aan grondwater verschillende hoeveelheden van de olie-achtige drijfslag, afkomstig van de verontreinigde site, toegevoegd. De olie-concentratie in deze monsters is vervolgens bepaald volgens de "standaard" methode: ontwerp NEN 5733. Hierbij wordt de vloeistof geëxtraheerd met hexaan, waarna het extract gaschromatografisch wordt geanalyseerd.

Bij de tweede en derde serie experimenten is de extractiestap van de olie-bepaling geoptimaliseerd voor rhamnolipide biosurfactants en polysaccharide biosurfactants. Hierbij zijn de volgende aanpassingen gedaan:

- verdubbeling van de hoeveelheid hexaan;
- uitvoeren van een dubbele extractie;
- aanzuren tot pH = 2 met 12 M HCl;
- op pH = 12 brengen met 5 M NaOH;
- toevoegen van 10 g/L NaCl.

De beoordeling gebeurde door visuele waarneming van emulsievorming. Vervolgens is het gehalte aan minerale olie bepaald van een reeks grondwatermonsters met en zonder biosurfactants met verschillende hoeveelheden drijfslagolie. De extractie werd hierbij uitgevoerd volgens de geoptimaliseerde methode voor de betreffende biosurfactants.

2.3 Resultaten en discussie

De resultaten van de experimenten met de "standaard" olie analyse zijn te zien in Figuur 2.1. In de grondwatermonsters wordt circa 90% van de toegevoegde hoeveelheid drijfslag gemeten als minerale olie. Het blijkt dat de aanwezigheid van rhamnolipide biosurfactants de recovery van olie uit het grondwater met een factor 1,56 verlaagt en dat de gebruikte extractie-methode dus niet geschikt is voor monsters waarin oppervlakte-actieve stoffen aanwezig zijn.

Figuur 2.1: resultaten van de "standaard" olie analyse in grondwatermonsters met (€) en zonder (+) biosurfactants.

Bij de uitvoering van de extracties in de aanwezigheid van rhamnolipide biosurfactants is de vorming van een duidelijke, stabiele emulsielaag op het grensvlak tussen de hexaan-fase en de waterfase waargenomen. Daarom is vervolgens een tweede serie experimenten uitgevoerd waarin de extractie-procedure in de aanwezigheid van rhamnolipiden is geoptimaliseerd. Het toevoegen van loog, het verdubbelen van de hoeveelheid hexaan en het uitvoeren van een dubbele extractie leidde niet tot het voorkomen van emulsievorming. Goede resultaten zijn gevonden bij de extractie van monster dat op pH 2 is gebracht en van monster waaraan 10 g/L NaCl was toegevoegd; bij de extractie van deze monsters werd geen noemenswaardige emulsievorming waargenomen. De duidelijkste hexaan-water scheiding was te zien bij het tot pH = 2 aangezuurde monster.

Vervolgens is nogmaals het oliegehalte van een reeks monsters met verschillende hoeveelheden drijf laag bepaald. Aan de monsters (met en zonder rhamnolipiden) was 10 g/L NaCl toegevoegd en de pH was op 2 gebracht. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Figuur 2.2.

Figuur 2.2: resultaten van de olie analyse met geoptimaliseerde extractie van grondwatermonsters met (€) en zonder (+) biosurfactants.

Ditmaal wordt opnieuw ca. 90% van de toegevoegde hoeveelheid drijfslaag als minerale olie gemeten. Tevens blijkt dat de resultaten van de monsters met en zonder biosurfactants goed overeenkomen en dat de gebruikte extractieprocedure dus voldoet voor monsters waarin rhamnolipiden voorkomen.

Ook bij de extractie van de effluënten uit de reactoren waarin door mengcultures biosurfactants werden geproduceerd (Hoofdstuk 4) werd een duidelijke emulgering van de hexaan-fase waargenomen. Van de geteste voorbehandelingen bleek alleen het toevoegen van NaOH tot een pH van 12 de emulgering te voorkomen. De validatie van de olie-analyses van de reactor-effluënten is uitgevoerd door standaard-additie van 500 mg/l minerale olie (drijfslaag) aan 2 van de monsters die vooraf op pH = 12 waren gebracht. In beide gevallen werd een recovery van meer dan 95% gevonden.

2.4 Conclusies

Circa 90% (w/w) van de drijflaag van de verontreinigde site wordt gemeten als minerale olie.

De aanwezigheid van biosurfactants (zowel rhamnolipiden als de door de mengcultures geproduceerde biosurfactants) in grondwatermonsters verstoort de bepaling van het gehalte aan minerale olie doordat tijdens de extractiestap emulsievorming optreedt.

Het blijkt dat het mogelijk is met eenvoudige voorbehandelingen de emulsievorming door de aanwezigheid van biosurfactants tegen te gaan. Bij de rhamnolipide biosurfactant moet het monster voorafgaand aan de extractie worden aangezuurd en moet 10 g/L NaCl worden toegevoegd; bij de door de mengcultures geproduceerde biosurfactants kan de emulsievorming worden opgeheven door het toevoegen van NaOH tot een pH van 12.

In het algemeen kan worden geconcludeerd dat bij de analyse van minerale olie in monsters waaraan (bio)surfactants aanwezig zijn, verstoring van de olie-analyse kan worden voorkomen door het tegengaan van emulsie-vorming tijdens de extractie. Dit kan in eenvoudige experimenten visueel worden beoordeeld. Daarnaast is het aan te raden het resultaat van de analyses steeds te valideren door standaard-additie van olie. Hoewel in dit project alleen de analyse van minerale olie is onderzocht, is het principe van toepassing op de analyse van alle organische verbindingen waarbij een extractie met een apolair oplosmiddel wordt uitgevoerd.

HOOFDSTUK 3. PRODUKTIE VAN BIOSURFACTANTS IN BATCH-EXPERIMENTEN

3.1 Inleiding

Het doel van dit projectonderdeel is het optimaliseren van de biosurfactant productie bij de afbraak van minerale olie in verontreinigd grondwater door van de verontreinigde site afkomstige gemengde bacteriecultures. De onderzochte parameters zijn het type en de concentratie van de koolstofbron, het type en de concentratie van de stikstofbron, de concentratie fosfaat en de toevoeging van een biosurfactant-producerende reinculture.

3.2 Materialen en methode

Het gebruikte grondwater is afkomstig uit het grondwater beheersingssysteem van de verontreinigde site. Bij de monstername is ook een monster van de op het water aanwezige drijflaag genomen. Deze drijflaag bestaat voor ca. 90% uit minerale olie, voornamelijk fracties C12-C24. Het gebruikte entmateriaal bestond steeds uit 1 ml van een gemengde olie-afbrekende culture die is opgehoopt uit het grondwater van de verontreinigde site. Dit zijn de micro-organismen die kunnen worden verwacht in een grondwaterzuiveringsreactor.

Alle experimenten zijn uitgevoerd bij 15°C in 500-ml serumflessen met 150 ml grondwater, afkomstig van de verontreinigde site. Het grondwater is gebufferd (pH = 7) met 50 mM fosfaat en er is een mengsel van mineralen en sporenelementen (zonder stikstof en fosfor) aan toegevoegd. De volgende variabelen zijn onderzocht:

- type en concentratie van de koolstofbron (drijflaag, acetaat, ethanol, aceton, glycerol, glucose, dieselolie, zonnebloemolie, *n*-hexaan, *n*-octaan, *n*-decaan, *n*-undecaan, *n*-dodecaan, *n*-tridecaan, *n*-hexadecaan);
 - type en concentratie van de stikstofbron (ammonium, nitraat, ureum);
 - concentratie van de fosfaatbron, hierbij werd als buffer 50 mM TRIS-HCl gebruikt;
 - toevoeging biosurfactant-producerende bacterie (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).
- Een gedetailleerd overzicht van de uitgevoerde experimenten wordt gegeven in Bijlage A.

De groei van de micro-organismen is beoordeeld door meting van de O₂-opname of door meting van de optische dichtheid bij 540 nm (OD₅₄₀).

De productie van biosurfactants is beoordeeld volgens 3 methoden:

- (1) meting van de oppervlaktespanning van het supernatant (verkregen door centrifugeren) van de batch cultures m.b.v. een Krüss Tensiometer. Bij surfactant concentraties onder de CMC (critical micelle concentration) bestaat een lineair verband tussen de daling van de oppervlaktespanning en de concentratie (bio)surfactant;
- (2) bepaling van de critical micelle dilution (CMD); bij surfactant concentraties boven de CMC daalt de oppervlaktespanning niet meer. Het aantal maal dat het supernatant verdund moet worden totdat de oppervlaktespanning begint te stijgen is dan een goede maat voor de (bio)surfactant concentratie;
- (3) bepaling van de emulgerende activiteit (EMA); hierbij wordt 0.1 ml van een 1:1 mengsel van hexadecaan en methylnaftaleen toegevoegd aan 4.9 ml 50 mM TRIS-HCl buffer pH = 7 met 0.1 ml van het te bepalen monster. Dit mengsel wordt vervolgens gedurende 30 s geschud en na 30 minuten wordt de OD₅₄₀ van de waterfase bepaald. De EMA wordt vervolgens berekend door de OD₅₄₀ te corrigeren voor blanco metingen en deze waarde te vermenigvuldigen met een factor 10.

3.3 Resultaten en discussie

Hieronder zullen de hoofdlijnen van de behaalde resultaten worden weergegeven en bediscussieerd. Een gedetailleerd overzicht van de uitgevoerde experimenten en de laagst gemeten oppervlaktespanningen per experiment zijn gegeven in Bijlage A.

Effect van de koolstofbron

Figuur 3.1: Verloop O₂-opname en oppervlaktespanning bij afbraak van 2.5 g/L drijfslaag.

De beste resultaten (lage oppervlaktespanning in combinatie met een hoge CMD) zijn gevonden met de drijfslaag als koolstofbron (3.33 ml/L) en met glycerol of zonnebloemolie als extra koolstofbron (0.66 resp. 1.33 ml/L). Alle overige geteste koolstofbronnen werden wel afgebroken (zuurstofopname en toename van de OD540), maar bij de afbraak werd een lagere daling van de oppervlaktespanning waargenomen dan bij de afbraak van de drijfslaag. Het verloop van de zuurstofopname en de oppervlaktespanning bij groei met de drijfslaag als koolstofbron is te zien in Figuur 3.1.

Er blijkt duidelijk dat productie van biosurfactants parallel loopt aan de afbraak van de koolstofbron. Bij het gebruik van 3.33 ml/L (ca. 2.5 g/L) drijfslaag als enige koolstofbron is de laagst waargenomen oppervlaktespanning 44 mN/m, hierbij was de CMD ca. 2.5. Bij lagere concentraties werden hogere oppervlaktespanningen gemeten, bij hogere concentraties werd geen verhoging van de biosurfactant-productie gevonden.

Het toevoegen van een extra koolstofbron naast de drijfslaag leidde in alle gevallen, met uitzondering van glycerol en zonnebloemolie, tot verhoogde groei zonder dat extra productie van oppervlakte-actieve stoffen werd waargenomen. Bij het gebruik van glycerol en zonnebloemolie als extra koolstofbron ging de verhoogde groei wel gepaard met een extra daling van de oppervlaktespanning, zoals te zien in Figuur 3.2. Bij gebruik van zonnebloemolie werd een laagste oppervlaktespanning van 41 mN/m gemeten met een bijbehorende CMD van 5 (Figuur 3.2A). De lage oppervlaktespanning bleef gedurende meerdere dagen gehandhaafd. Met glycerol als extra koolstofbron was de laagst gemeten oppervlaktespanning 39 mN/m, de CMD was echter laag en de oppervlakte-actieve stoffen waren weer vrij snel verdwenen (Figuur 3.2B). Omdat de toename van de oppervlaktespanning gepaard ging met een toename van de zuurstofopname, lijkt het waarschijnlijk dat de biosurfactants biologisch werden afgebroken. In geen van de experimenten is een hoge emulgerende activiteit waargenomen. De hoogste EMA (3.7) is gemeten bij het gebruik van de drijfslaag met acetaat als extra koolstofbron.

Figuur 3.2: Verloop zuurstofopname en oppervlaktespanning bij afbraak van 1 g/L drijf laag olie met 0.5 g/L glycerol (A) of 1 g/L zonnebloemolie (B) als extra koolstofbron.

Effect van de stikstof- en fosforbron

Het effect van het type en concentratie van de stikstofbron op de productie van oppervlakte-actieve stoffen bleek geringer dan dat van de koolstofbron. Het gebruik van ammonium bleek iets betere resultaten te geven dan het gebruik van nitraat en ureum, een mogelijke verklaring hiervoor is dat tijdens de ophoping van de bacteriecultures ammonium als stikstofbron is gebruikt. Verder is gevonden dat voldoende stikstof aanwezig moet zijn om de volledige afbraak van de koolstofbron mogelijk te maken. Groei op verschillende koolstofbronnen (drijf laag, glucose, glycerol, hexadecaan, dieselolie) onder stikstof-limitatie leidde niet tot een verhoogde productie van oppervlakte-actieve stoffen.

Het effect van de fosfaat concentratie op de biosurfactant-productie is vergelijkbaar met dat van de stikstof concentratie. De beste resultaten werden gevonden wanneer voldoende fosfaat aanwezig was om de complete afbraak van de aanwezige koolstofbron mogelijk te maken. Bij lage fosfaat concentraties werden hogere oppervlaktetenspanningen gemeten en er is geconcludeerd dat fosfaat-limitatie niet leidt tot verhoging van de biosurfactant productie bij de afbraak van minerale olie door mengcultures.

Effect van biosurfactant producerende bacteriestam

De bacterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is een bekend biosurfactant producerend micro-organisme. Bij groei op glucose onder fosfaat-limiterende omstandigheden worden door dit organisme grote hoeveelheden glycolipiden met oppervlakte-actieve eigenschappen in het medium uitgescheiden. Het toevoegen van deze bacteriestam aan grondwater met olie en glucose onder fosfaat-limitatie resulteerde inderdaad in de productie van biosurfactants. Na 7 dagen incubatie bij 15°C werd in het supernatant van de culture een oppervlakte- spanning van 30 mN/m waargenomen met een bijbehorende CMD van 6. Wanneer er naast de reiculture echter ook geënt werd met de ophopingsculture bleek de aanwezigheid van de *Pseudomonas aeruginosa* stam niet te leiden tot een verhoogde productie van oppervlakte-actieve stoffen. Blijkbaar verliest de bacterie de concurrentie met de micro-organismen uit de ophopingsculture of zijn de omstandigheden niet goed voor biosurfactant-productie.

3.4 Conclusies

Het is mogelijk gebleken om de produktie van biosurfactants te stimuleren tijdens de batchgewijze afbraak van minerale olie. Van de onderzochte factoren bleek dat de fosforbron en de toevoeging van een biosurfactant-producerende bacteriestam geen noemenswaardig effect hebben op de produktie van oppervlakte-actieve stoffen. Het type stikstofbron had wel enige invloed op de produktie van oppervlakte-actieve stoffen: ammonium was een betere stikstofbron dan nitraat en ureum. De concentratie van de stikstofbron had geen duidelijke invloed op de produktie van biosurfactants.

Het type en de concentratie van de koolstofbron hebben wel een duidelijke invloed op de produktie van oppervlakte-actieve stoffen. De van de verontreinigde lokatie afkomstige olie-achtige drijfslag bleek de meest geschikte koolstofbron te zijn. Toevoeging van glycerol en zonnebloemolie als extra koolstofbron leidde tot een verder verhoging van de produktie van oppervlakte-actieve stoffen. Hiermee werd in batchgewijze experimenten de doelstelling van fase I van het project (een oppervlaktespanning < 45 met een CMD van 3) gerealiseerd. Deze resultaten zijn veelbelovend omdat de olie van de verontreinigde site tijdens een reiniging veelal eenvoudig verkrijgbaar is uit de olie/water scheider en omdat zonnebloemolie een goedkoop en ongevaarlijk additief is.

Bij het verder gebruik van een slecht oplosbare verbinding zoals zonnebloemolie als extra koolstofbron, zal waarschijnlijk vooral worden geselecteerd op organismen die bio-emulsifiers produceren. Omdat deze verbindingen een minder sterke oppervlakte-actieve werking hebben dan glycolipiden en lipopeptiden is de emulgerende activiteit een betere maat voor de produktie van bio-emulsifiers dan de oppervlaktespanning.

HOOFDSTUK 4 OPTIMALISATIE PRODUCTIE BIOSURFACTANTS IN REACTOR-EXPERIMENTEN

4.1 Inleiding

Tijdens batch experimenten is gevonden dat het mogelijk is bij groei op olie, afkomstig van het verontreinigde terrein, de productie van oppervlakte-actieve verbindingen te stimuleren. In dit hoofdstuk wordt de optimalisatie van de productie van oppervlakte-actieve verbindingen tijdens continue of semi-continue afbraak van minerale olie in reactoren beschreven.

4.2 Materialen en methode

Het gebruikte grondwater is afkomstig uit het grondwater beheersingssysteem van het verontreinigde terrein. Bij de monsternamen is ook een monster van de op het water aanwezige drijfslag genomen. Deze drijfslag bestaat voor ca. 90% uit minerale olie, voornamelijk fracties C12-C24. Het gebruikte entmateriaal bestond uit een gemengde olie-afbrekende culture die is opgehoopt uit het grondwater van het verontreinigde terrein.

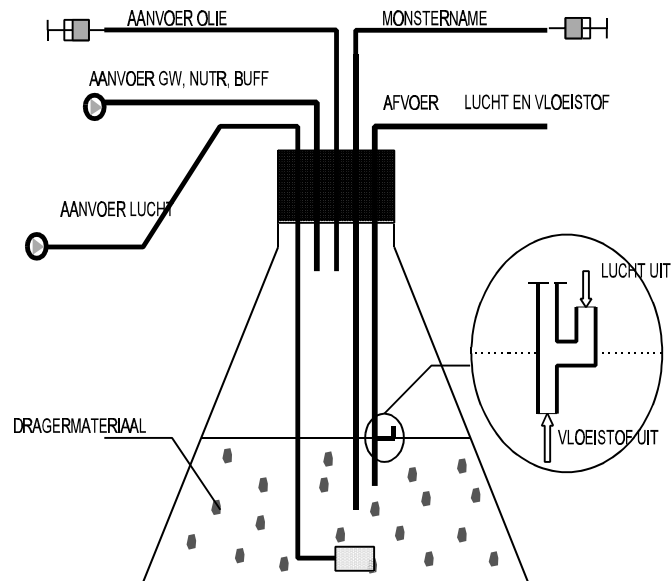
Alle experimenten zijn uitgevoerd bij 20°C in aërobe 2-L reactoren met 1000 ml grondwater, afkomstig van het verontreinigde terrein. Met fosfaat gebufferd (pH = 7) grondwater met een mengsel van zouten en sporenelementen (in overmaat) werd via een slangenpomp toegevoegd. De buffersterkte was 25 mM bij de continue experimenten en 50 mM bij de fed batch experimenten. De koolstofbron (minerale olie en/of zonnebloemolie) werd apart toegediend via een perfusiepompe. De zuurstofvoorziening gebeurde door via een bruissteen bevochtigde perslucht door de reactoren te leiden. Menging vond plaats d.m.v een magneetroerder (600 rpm). Om het uitspoelen van biomassa tegen te gaan waren blokjes PUR schuim (doorsnede ca. 3 mm) aan de reactoren toegevoegd. De afvoer van gas en vloeistof gebeurde door overdruk, waarbij de vloeistof niet van het oppervlak werd afgevoerd aangezien dit een selectieve verwijdering van olie tot gevolg zou kunnen hebben. Een schematisch overzicht van een reactor is gegeven in Figuur 4.1.

Fed batch experimenten werden opgestart door de cultuurvloeistof uit een reactor te vervangen door nieuw grondwater, waarbij het dragermateriaal met de daaraan gehechte micro-organismen achterbleef. Hieraan werd vervolgens gedurende 4-6 dagen via een perfusiepompe 1 ml olie per dag toegevoerd zonder dat afvoer van vloeistof plaatsvond.

De volgende variabelen zijn onderzocht tijdens de reactor-experimenten:

- de concentratie van de koolstofbron (minerale olie 1, 2 en 4 ml/L);
- verblijftijd in de reactor (6, 24 en 48 h);
- toevoeging van cosubstraat (zonnebloemolie in gelijk of dubbel volume);
- wijze van bedrijven (continue en fed batch)

Een schema met de verschillende onderzochte procesvariabelen is gegeven in Tabel 4.1



Figuur 4.1: Experimentele opzet van de continue experimenten.

Tabel 4.1: overzicht uitvoering reactor-experimenten

Reactor	Dag	Koolstofbron		Grondwater		Wijze van bedrijven
		Concentratie (ml/L)	DL:ZBO	Flow (L/d)	P-buffer (mM)	
A	1 - 28	2	1:1	1	25	Continu, HRT = 24h
	28 - 48	4	1:1	1	25	Continu, HRT = 24h
	48 - 72	n.v.t.	1:2	0	50	Fed-batch
	72 -	n.v.t.	1:2	0	50	Fed-batch
B	1 - 27	1	1:1	1	25	Continu, HRT = 24
	28 - 48	2	1:1	1	25	Continu, HRT = 24
	48 - 61	n.v.t.	1:1	0	50	Fed-batch
	61 - 72	n.v.t.	1:2	0	50	Fed-batch
	72 -	n.v.t.	0:1	0	50	Fed-batch
C	1 - 21	1	1:0	1	25	Continu, HRT = 24 h
	21 - 26	2	1:0	1	25	Continu, HRT = 24 h
	26 - 32	1	1:2	4	25	Continu, HRT = 6 h
	32 - 38	1	1:2	1	25	Continu, HRT = 24 h
	38 - 47	1	1:2	0,5	25	Continu, HRT = 48 h
D	1 - 21	2	1:0	1	25	Continu, HRT = 24 h
	21 - 26	4	1:0	1	25	Continu, HRT = 24 h
	26 - 32	1	1:1	4	25	Continu, HRT = 6 h
	32 - 38	1	1:1	1	25	Continu, HRT = 24 h
	38 - 47	1	1:1	0,5	25	Continu, HRT = 48 h

DL = olie van drijfslaag, ZBO = zonnebloemolie, HRT = hydraulische retentietijd.

De biologische activiteit is beoordeeld door het volgen van de zuurstofspanning in de cultuurvloeistof en door periodieke meting van de hoeveelheid CO₂ in het afgas via opvang in

loog. Olie in het effluent werd periodiek bepaald volgens afgeleide NEN 5747, waarbij om emulsiëvorming te voorkomen de extractie werd uitgevoerd met monsters met een pH > 12 (zie Hoofdstuk 2).

De produktie van biosurfactants is beoordeeld aan de hand van de volgende 3 parameters:

- (1) oppervlaktespanning van het supernatant (verkregen door centrifugeren) van de cultures; bepaald m.b.v. een Krüss Tensiometer. Bij surfactant concentraties onder de CMC (critical micelle concentration) bestaat een lineair verband tussen de daling van de oppervlaktespanning en de concentratie (bio)surfactant;
- (2) critical micelle dilution (CMD); bij surfactant concentraties boven de CMC daalt de oppervlaktespanning niet meer. Het aantal maal dat verdund moet worden totdat de oppervlaktespanning begint te stijgen is een maat voor de surfactant concentratie;
- (3) emulgerende activiteit; hiervoor zijn twee bepalingmethoden gebruikt:
 - a) EMA-methode [bv Van Dyke *et al.* 1992]. 0.1 ml van een 1:1 mengsel van hexadecaan en methylnaftaleen wordt toegevoegd aan 4.9 ml 50 mM TRIS-HCl buffer pH = 7 met 0.1 ml van het te bepalen monster. Dit mengsel wordt vervolgens gedurende 30 s geschud en na 30 minuten wordt de OD₅₄₀ van de waterfase bepaald. De EMA wordt vervolgens berekend door de OD₅₄₀ te corrigeren voor blanco metingen en deze waarde te vermenigvuldigen met een factor 10.
 - b) E₂₄ methode [bv Banat 1993]. Aan 3 ml van het te onderzoeken monster wordt 3 ml van de olie van de drijf laag toegevoegd. Dit mengsel wordt vervolgens gedurende 30 s sterk geschud. Na 24 h wordt de E₂₄ bepaald als:
(hoogte van de geëmulgeerde laag) / (totale hoogte) x 100%.

4.3 Resultaten en discussie

Produktie van biosurfactants tijdens continue afbraak van minerale olie

Een karakteristiek voorbeeld van de eerste resultaten van de continue experimenten is te zien in Figuur 4.2 voor de reactor met 2 ml/L minerale olie. Technische problemen (regeling van vloeistof- en gas-debiten) zorgden ervoor dat gedurende de eerste 2-3 weken geen constante omstandigheden in de reactoren heersten. In Figuur 4.2 is te zien dat de perioden met hoge zuurstofconcentraties samen vallen met die met lage oppervlaktespanningen. Onder zuurstoflimitatie produceren de micro-organismen blijkbaar minder oppervlakte-actieve stoffen. Daarom is bij de latere experimenten gepoogd geen zuurstoflimitatie op te laten treden. Hierbij zijn dan ook over het algemeen minder grote schommelingen gevonden.

Figuur 4.2: Verloop oppervlaktespanning en zuurstofconcentratie bij afbraak van 2 ml/L drijfslaagolie in grondwater. Symbolen: ~ zuurstofconcentratie; € oppervlaktespanning.

Uit de metingen van CO₂ in het afgas bleek dat van de hoeveelheid koolstof die als olie werd toegevoegd ca. 40% werd teruggevonden als CO₂. Dit percentage was onafhankelijk van de samenstelling van de koolstofbron. Omdat de olie-afbraak niet het hoofddoel van het onderzoek is, zijn geen verdere bepalingen voor het opstellen van een massabalans uitgevoerd, maar er wordt aangenomen dat de overige koolstof is gebruikt voor celgroei en productie van extracellulaire verbindingen zoals biosurfactants.

De resultaten van de olie-analyses van het effluent van de reactoren staan gegeven in Tabel 4.2. De gevonden olie-concentraties onder omstandigheden met voldoende zuurstof zijn iets hoger dan de interventiewaarden voor grondwater (0.6 mg/L). Hierbij moet bedacht worden dat de influent concentraties van de minerale olie 300 tot 450 mg/L waren.

Tabel 4.2: zuurstofconcentraties en olie-concentraties in het effluent onder verschillende reactor-condities.

reactor conditie	O ₂ in effluent (mg/L)	olie in effluent (mg/L)
continu; 1:2 drijfslaag:zonnebloemolie; HRT = 24 h	0.8	4.16
continu; 1:1 drijfslaag:zonnebloemolie; HRT = 24 h	3.0	3.44
continu; 1:2 drijfslaag:zonnebloemolie; HRT = 48 h	0.1	17.20

continu; 1:1 drijf laag:zonnebloemolie; HRT = 48 h	2.4	1.12
continu; 1:2 drijf laag:zonnebloemolie; HRT = 48 h	1.3	5.60
fed batch; 1:2 drijf laag:zonnebloemolie	1.8	1.24

Effect van de concentratie minerale olie

Het is gebleken dat het verhogen van de minerale olie-concentratie gepaard gaat met een licht verhoogde produktie van oppervlakte-actieve stoffen. Bij een minerale olie-concentratie van 2 ml/L werd een laagste oppervlaktespanning van ca. 42 mN/m gemeten; bij 4 ml/L minerale olie was de laagst gemeten oppervlaktespanning 40 mN/m. Er werd echter geen verschil in de emulgerende werking (E_{24}) gevonden. Het verhogen van de concentratie aan minerale olie lijkt daarom geen geschikte methode om de produktie van biosurfactants te stimuleren.

Effect van de verblijftijd

Het variëren van de verblijftijd heeft een duidelijk effect op de oppervlakte-actieve eigenschappen van het effluent. In Figuur 4.3 wordt de oppervlaktespanning van het effluent weergegeven voor drie verschillende hydraulische retentietijden: 6, 24 en 48 h. Bij een hydraulische retentietijd van 6 h werden de hoogste oppervlaktespanningen gemeten. Tevens bleek dat er nog olie in het effluent aanwezig was. Een hydraulische retentietijd van 48 h geeft de beste resultaten, hoewel het verschil met een retentietijd van 24 h niet groot is. In beide gevallen werd een E_{24} van 10-30% gemeten.

Figuur 4.3: Effect van de hydraulische retentietijd op de oppervlaktespanning bij gebruik van 1 ml/L drijf laagolie als koolstofbron. Symbolen: τ) retentietijd; ϵ) oppervlaktespanning.

Effect van de toevoeging van zonnebloemolie

Bij experimenten waarbij zonnebloemolie werd toegevoegd werd in alle gevallen een sterke verhoging van de optische dichtheid van de reactorvloeistof waargenomen. Centrifugeren van de vloeistof leidde slechts tot een gedeeltelijke verlaging hiervan. Microscopische waarnemingen toonden aan dat de hoge optische dichtheid niet werd veroorzaakt door de aanwezigheid van grote aantallen micro-organismen. De meest waarschijnlijke verklaring hiervoor is de aanwezigheid van een emulsie. Tevens werd gevonden dat het gebruik van zonnebloemolie leidde tot lagere concentraties aan minerale olie in het effluent.

Figuur 4.4: *Effect van toevoeging van zonnebloemolie op de produktie van oppervlakte-actieve verbindingen. Symbolen: ~ alleen drijfslaagolie; € 1:2 drijfslaagolie:zonnebloemolie*

Door de hoge optische dichtheid van het supernatant was het niet mogelijk om de emulgerende activiteit te bepalen via de EMA methode. Hierbij is namelijk de optische dichtheid van het monster een maat voor de emulgering van de toegevoegde organische fase. Daarom is verder de E_{24} -methode gebruikt. Het voordeel van deze methode is dat het een directe maat is voor het gewenste effect, het emulgeren van de drijfslaagolie. Nadelen zijn dat het minder goed mogelijk is de gemeten waarden te vergelijken met waarden uit de literatuur en dat de onderzoeksdoelstelling niet is gebaseerd op de E_{24} -methode.

Vergelijking van de oppervlaktetenspanning van effluenten van reactoren met en zonder zonnebloemolie (Fig. 4.4) laat zien dat de aanwezigheid hiervan de produktie van oppervlakte-actieve stoffen stimuleert. Dit geldt in sterkere mate voor de produktie van emulgerende verbindingen. De gemeten waarden voor de E_{24} van de effluenten lag bij de experimenten met een retentietijd van 48 h in de experimenten zonder zonnebloemolie rond de 10-30%; het toevoegen van zonnebloemolie resulteerde in een E_{24} van ca. 40-60%.

Effect van de wijze van bedrijven

Na afloop van de continue experimenten zijn 2 reactoren bedreven als fed batch. Hierbij werd de vloeistof uit de reactoren verwijderd en vervangen door nieuw grondwater, waarna met constante snelheid olie werd toegevoerd zonder dat afvoer van vloeistof plaatsvond. De resultaten, behaald met 1:2 drijfslaagolie:zonnebloemolie als koolstofbron (reactor A) in de fed batch experimenten, zijn weergegeven in Figuur 4.5. Het blijkt dat bij alle drie de fed batch experimenten in 4-5 dagen tijd de emulgerende activiteit sterk toeneemt. De uiteindelijke waarde van de E_{24} was in alle gevallen ca. 60-80%, een waarde die vergelijkbaar is met die van door reïncultures geproduceerde bio-emulsifiers [Banat 1993, Iqbal *et al* 1995, Marin *et al.* 1996]. In Figuur 4.6 is voor de effluenten van de reactoren waaraan zonnebloemolie werd toegevoegd de relatie tussen de oppervlakte-spanning en de E_{24} weergegeven. Hoewel een grote spreiding tussen de resultaten gevonden wordt, blijkt dat bij hoge E_{24} waarden (> 60%) vrijwel altijd een oppervlaktetenspanning tussen de 40 en 50 wordt gemeten en dat bij lage E_{24} waarden de oppervlaktetenspanning meestal boven de 55 ligt.

Figuur 4.5: E_{24} en oppervlaktetenspanning bij fed batch experimenten met 1:2 drijfslaagolie: zonnebloemolie. Symbolen:)) hvh toegevoegde olie; € E_{24} ; ~ oppervlaktetenspanning;

Figuur 4.6: *Relatie tussen oppervlaktespanning en E_{24} voor reactor-experimenten met 1:2 drijfslaagolie: zonnebloemolie als koolstofbron.*

4.4 Conclusies

Tijdens continue afbraak van olie in de reactoren vindt structurele productie van bio-surfactants plaats. Door de kleine debieten is het moeilijk om op laboratoriumschaal een constante toevoer van olie te realiseren; de fluctuaties hierin zijn terug te zien in de productie van biosurfactants. Op grotere schaal zijn minder fluctuaties te verwachten. Het optreden van een zuurstoflimitatie heeft een negatief effect op zowel de afbraak van de olie als op de productie van biosurfactants.

Het toevoegen van zonnebloemolie werkt positief op de productie van biosurfactants en vooral van bio-emulsifiers. Een ander voordeel van het toevoegen van zonnebloemolie is dat in de aanwezigheid ervan de hoeveelheid minerale olie in het effluent lager is dan wanneer alleen minerale olie als koolstofbron wordt gebruikt. Dit is waarschijnlijk een verdunningseffect. Zonnebloemolie wordt bij de olie-analyse niet gemeten als minerale olie.

Bij de afbraak van olie in een als fed batch bedreven reactor wordt een hogere productie van oppervlakte-actieve stoffen, en met name die van bio-emulsifiers gevonden dan bij de continue afbraak. Het lijkt daarom beter om in de praktijk gebruik te maken van een fed batch systeem. Dit betekent dat het niet haalbaar lijkt om zowel de reiniging van het afvalwater als de biosurfactant productie in één reactor uit te voeren.

HOOFDSTUK 5 KARAKTERISERING VAN DE GEPRODUCEERDE BIOSURFACTANTS

5.1 Inleiding

De doelstelling van het hier beschreven projectonderdeel was het karakteriseren van de actieve emulgerende biosurfactants die worden geproduceerd door de uit de verontreinigde locatie afkomstige gemengde culture. Er is gewerkt met effluenten van twee reactoren waarin deze biosurfactants zijn geproduceerd. Het onderzoek is gericht op water-oplosbare biosurfactants omdat voor applicatie de biosurfactants door de bodem getransporteerd moeten kunnen worden. Een vereiste hiervoor is dat de biosurfactants in water oplosbaar zijn. De zogenaamde "particulate" biosurfactants en de celwand-geassocieerde biosurfactants worden niet bestudeerd.

Om de emulgerende component(en) uit de aangeleverde oplossingen te kunnen identificeren zijn deze oplossingen door centrifugatie, filtratie, ammoniumsulfaat precipitatie, ethanol extractie/precipitatie en dialyse gefractioneerd en geanalyseerd op emulgerende activiteit. De emulgerende component is vervolgens chemisch gekarakteriseerd.

5.2 Fractionering effluenten en isolatie biosurfactant

Effluenten.

Effluenten van twee reactoren waarin de van de site afkomstige culture is gekweekt zijn aangeleverd door MTI. Het gaat hierbij om effluenten van reactor A van 28 juni 1996 (fed batch) en van reactor C van 20 juni 1996 (continue). Enige eigenschappen van de effluenten zijn vermeld in Tabel 5.1. Alhoewel de oppervlaktespanning van effluent uit reactor A hoger is, is deze oplossing toch verder onderzocht vanwege de goede emulgerende activiteit (: EMA, Tabel 5.1).

Het melkachtige uiterlijk en de hoge optische dichtheid bij 450 nm duiden op aanwezigheid van veel biomassa en deeltjes. Analyse met de lichtmicroscopie liet zien dat er cellen (voornamelijk staafjes) en deeltjes in de effluenten aanwezig waren.

Centrifugatie en filtratie.

Nadat de pH van de effluenten op 7 was gesteld is het effluent gecentrifugeerd om biomassa te verwijderen (18.000 rpm gedurende 30 minuten). Het supernatant bleef troebel (fractie C, Fig. 5.1). Microscopische analyse toonde aan dat er in het supernatant nauwelijks bacteriën aanwezig waren. Wel waren nog veel deeltjes te zien. Na filtratie door een 45 : m filter werd een heldere oplossing verkregen (fractie S, Fig 5.1). Het filter raakte door de hoge concentratie deeltjes zeer snel verstopt.

Tabel 5.1: Enige eigenschappen van de effluenten uit reactoren beënt met culture, opgehoopt uit grond van het verontreinigde terrein.

Eigenschap	Effluent reactor A	Effluent reactor C
oppervlaktespanning ¹	56 mN/m	44 mN/m
E ₂₄ ^{1,2}	55 %	> 95 %
optische dichtheid bij 450 nm	25 AU	20 AU
kleur	wit, melkachtig	gelig, melkachtig
: EMA ³ , na centrifugatie	0.7 AU	0.7 AU

¹ zie Hoofdstuk 4

² emulgerende activiteit (%) o.a. beschreven door Cooper en Goldenberg [1987]

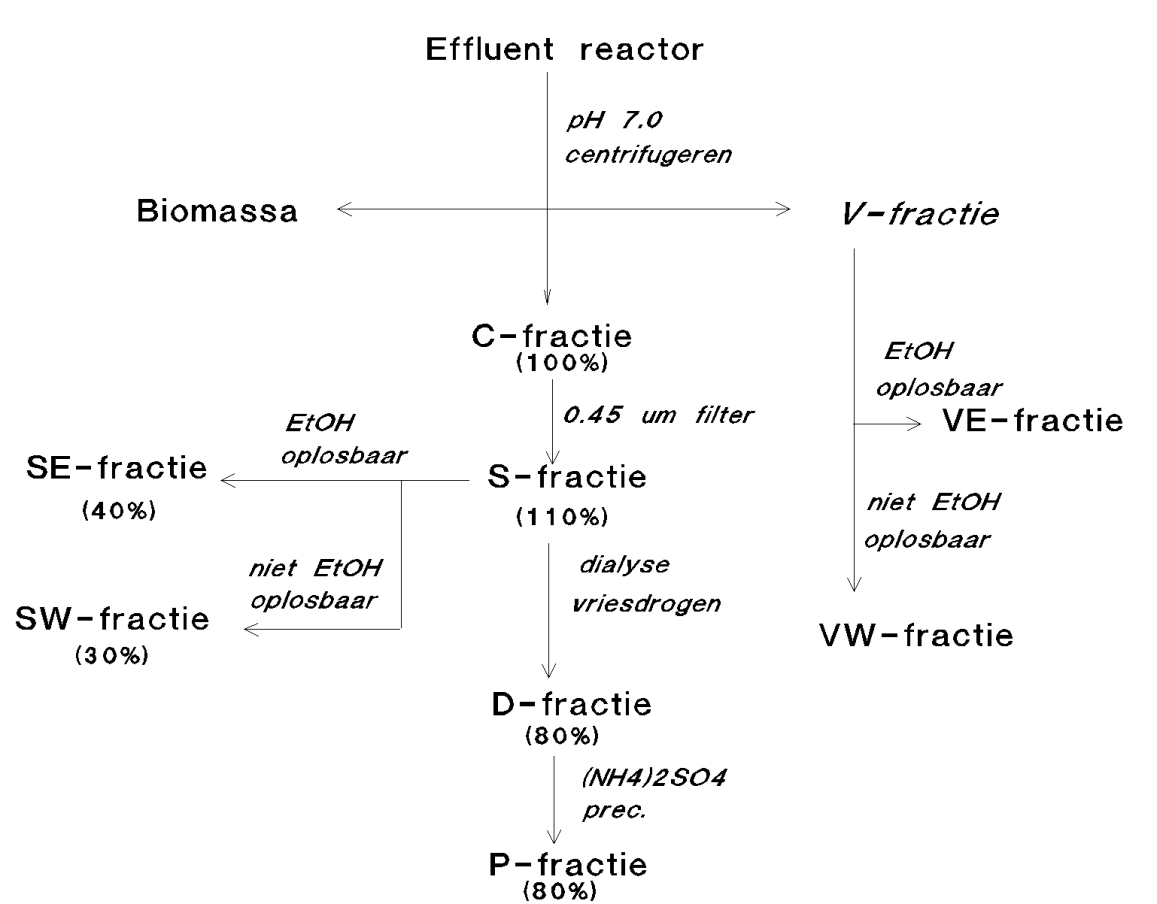
³ emulgerende activiteit (in absorptie eenheden) gemeten met de microtiter-emulgeringsassay (*vide infra*).

Microtiter-emulgeringsassay

Om niet op grote schaal fractioneringen uit te hoeven voeren, is een assay ontwikkeld waarmee emulgerende activiteit bepaald kan worden in kleine hoeveelheden oplossing. In een microtiterplaat werd 100 : l monster en 10 : l hexadecaan gebracht en geëmulgeerd door de oplossing tien maal door een glasspuit met dunne naald te halen. Een controle van dezelfde oplossing zonder hexadecaan werd op dezelfde manier behandeld. Na 60 minuten werd in een microplate reader (Biorad model 3550) de absorptie bij 450 nm gemeten tegen 100 : l oplossing waaraan geen hexadecaan is toegevoegd. Deze waarde wordt de : EMA (microtiter EMulgerende Activiteit) waarde genoemd, en wordt uitgedrukt in absorptie eenheden (AU). Op deze manier is emulgerende activiteit waar te nemen tot 10% van de concentratie van in effluent A aanwezige biosurfactants. Dit blijkt ongeveer 0.1 mg/ml te zijn (*vide infra*). De foutenmarge in de respons is echter dusdanig groot dat deze assay slechts semi-kwantitatieve informatie verschaft. Bij een : EMA waarde groter is dan 0.2 AU wordt de aanwezigheid van emulgerende verbindingen verondersteld.

Dialyse

Fractie S werd in een dialyse slang met een moleculaire ondergrens van 12-14 kDa tegen gedemineraliseerd water gedialyseerd. Na vriesdrogen van de niet-dialyseerbare fractie werd 1.2 gram vaste stof per liter effluent verkregen (fractie D). Bij TLC analyse van deze fractie waren geen componenten te zien.



Figuur 5.1: Schematische weergave van de isolatie van emulgerende componenten uit effluent van de reactoren. Tussen haakjes is de emulgerende activiteit van de fractie uit reactor A (: EMA) in % van de activiteit in fractie C weergegeven:

(: EMA -: EMA_{water}) / (: EMA_{fractie C} -: EMA_{water}) * 100% / concentratiefactor.

Emulgerende activiteit

De emulgerende activiteit van het effluent van reactor A en de fracties C en D uit deze reactor zijn te zien in figuur 5.2 in respectievelijk buis 2, 3 en 4. De concentratie van fractie D was 1 g/L in demi-water. Twee ml van deze oplossingen werden gedurende 30 seconden geëmulgeerd met 1 ml drijfvlagolie van het verontreinigde terrein. Vervolgens werden de emulsies weggezet. Na 5 uur werden de emulsies bekeken (Fig. 5.2). Deze emulsies waren gedurende meer dan 24 uur stabiel. In buis 1 is geen biosurfactant toegevoegd. In deze buis, een blanco, is geen emulgering zichtbaar. In buis 2 is de sterke emulgerende activiteit van het effluent uit reactor A duidelijk. Emulgerende werking is, in iets mindere mate, ook waarneembaar in de fractie verkregen na centrifugatie (fractie C, buis 3). Niet alle troebeling in de waterlaag van buizen 2 en 3 wordt veroorzaakt door emulgerende activiteit aangezien (vóór toevoeging van olie) beide oplossingen al troebel waren. Nagenoeg alle emulgerende activiteit van fractie C werd teruggevonden in D (zie ook : EMA, Tabel 5.2). Daarom wordt aangenomen dat de geproduceerde biosurfactants in fractie D aanwezig zijn.

Figuur 5.2: Effect van verschillende fracties uit de reactor-effluenten en enige biosurfactants op emulsie van water en drijfslaagolie van de verontreinigde locatie. Buis 1: blanco (water); buis 2: reactor effluent; buis 3: fractie C; buis 4: fractie D; buis 5: fractie V; buis 6: rhamnolipide; buis 7: Emulsan; buis 8: sophorolipide. De concentratie van de fracties en biosurfactants in buizen 4 tot 8 is 1 g/L. Reactor effluent en fractie C zijn in oorspronkelijke concentratie toegevoegd. Twee ml oplossing werd met 1 ml drijfslaagolie geëmulgeerd, de opname is genomen na 5 hr.

Ammoniumsulfaat precipitatie

Met behulp van ammoniumsulfaat precipitatie is geprobeerd fractie D verder te fractioneren. Pas bij 68% ammoniumsulfaat-verzadiging vormde zich een witte wolk die op het oppervlak bleef drijven (fractie P). Deze component bleek na oplossen in water de oorspronkelijke emulgerende activiteit te bezitten (Tabel 5.2), terwijl in de achtergebleven oplossing geen emulgerende activiteit meer te vinden was. Bij hogere ammoniumsulfaat-concentratie werd geen verdere neerslag gevonden. Aangezien fractie D met ammoniumsulfaat precipitatie niet verder te fractioneren was lijkt de emulgerende verbinding homogeen te zijn.

Ethanol extractie/precipitatie

Na vriesdrogen van fractie S werd deze verder gefractioneerd door extractie/precipitatie met ethanol. Na toevoeging van ethanol vormde zich witte vlokken. De ethanol werd afgepipeteerd en afgedampt. De achterblijvende gelige olie werd opgelost in water (fractie SE). De niet in ethanol oplosbare fractie was makkelijk op te lossen in water (fractie SW). Zowel fractie SE en SW vertoonden emulgerende activiteit (Tabel 5.2). Op grond van de emulgerende activiteit, de afwezigheid van lipiden, het uiterlijk, de TLC analyses en de wateroplosbaarheid wordt verondersteld dat de SW fractie dezelfde emulgerende component bevat als fractie D. TLC analyse van fracties SE toonde een verbinding die met jood (algemene kleuring) te detecteren was maar niet met rhodamine 6G (lipide kleuring) en anthrone (suiker kleuring) [Kates, 1972]. De verbindingen in fractie SE zijn daarom geen (glyco)lipiden. De fractie is niet verder gekarakteriseerd.

Tabel 5.2: : EMA waarden van de verschillende fracties geïsoleerd uit effluenten van reactor A en reactor C. De : EMA waarde is de absorptie bij 450 nm van de emulsie gecorrigeerd voor de absorptie van de oplossing als gemeten in de microtiter-emulgeringsassay (absorptie eenheden, AU).

fracties	reactor A	reactor C
C ¹	0.7	0.7
S ¹	0.8	0.8
SW ¹	0.3	0.4
SE ¹	0.35	0.5
D ²	0.5	0.4
P ²	0.5	fractie niet geïsoleerd
VW ^{1,3}	fractie niet aanwezig	0.2
VE ^{1,3}	fractie niet aanwezig	0.2

¹ concentratie als aanwezig in het effluent

² concentratie 1 mg/ml (concentratie van deze component in effluent is 1.2 mg/ml)

³ de : EMA van deze fracties is moeilijk vast te stellen aangezien de oplossingen van zichzelf troebel waren.

Fractie V

In het effluent uit reactor C scheidden zich bij centrifugatie grote hoeveelheden van een witachtige substantie op het oppervlak af (fractie V, Fig. 5.2). Deze substantie loste noch in water, noch in een organisch oplosmiddel op. Een dergelijke fractie wordt vaak waargenomen bij Gram-negatieve bacteriën, en bestaat uit lipopolysacchariden uit het buitenmembraan [De Smet, 1982]. Deze fractie is niet in staat emulsies te vormen (Fig 5.2, buis 5: 1 g/L fractie V). Ook het in ethanol oplosbare gedeelte van fractie V, fractie VE, bezit nauwelijks emulgerende activiteit (Tabel 5.2). In deze fractie zijn met TLC analyse enige componenten waargenomen die zowel met anthrone als met jood en rhodamine 6G waarneembaar waren. GC-MS analyse van fractie V toonde de aanwezigheid van langketenige vetzuren (voornamelijk hexadecaanzuur en bi-onverzadigd octadecaanzuur) aan. Deze fractie lijkt glycolipiden te bevatten [Kates, 1972], wat goed overeenkomt met de bevindingen van De Smet, die concludeerde dat deze fractie lipopolysacchariden zijn. Omdat fractie V nauwelijks emulgerende activiteit vertoont (Tabel 5.2), is deze niet verder gekarakteriseerd.

Vergelijking effluenten reactoren

De effluenten uit beide reactoren geven hetzelfde beeld, op de fractie V van reactor C na. Er wordt geconcludeerd dat de biosurfactants (en wellicht de producerende organismen) in beide reactoren dezelfde zijn.

Vergelijking emulgerende activiteit met andere biosurfactants

De emulgerende activiteit van het biosurfactant in fractie D werd vergeleken met de emulgerende activiteit van drie bekende biosurfactants: rhamnolipide, emulsan en sophorolipide. Alle biosurfactants (1 g/L) werden met drijf-laagolie geëmulgeerd volgens het boven beschreven protocol (Fig. 5.2). De emulsies waren stabiel gedurende meer dan 24 uur. Rhamnolipide is een anionisch glycolipide met een gemiddeld moleculegewicht van 600 Da (buis 6). Emulsan is een hoogmoleculair heteropolysaccharide (buis 7). Sophorolipide is een door gist geproduceerd biosurfactant en bestaat uit zes tot acht verschillende anionische en nonionische glycolipiden met sophorose als kopgroep (buis 8). Fractie D is te zien in buis 4. De

emulgerende activiteit van fractie D is vergelijkbaar met de activiteit van emulsan. De emulgerende activiteit van beide laagmoleculaire biosurfactants was aanmerkelijk hoger dan de activiteit van fractie D en emulsan, alhoewel de emulsie veroorzaakt door sophorolipiden sneller uitzakte.

5.3 Karakterisering biosurfactant

Uit de bovenstaande fractioneringen blijkt dat de meeste emulgerende activiteit in de effluenten van beide reactoren te vinden is in fractie D. De biosurfactants in deze fractie van reactor A zijn verder gekarakteriseerd.

Suikerbepaling

Suikeranalyses zijn gedaan volgens de anthrone methode [Hodge & Hofreiter, 1962] en met de 6-deoxyhexose assay [Chandrasekaran & BeMiller, 1980]. Het biosurfactant in fractie D bevat 40% D-glucose equivalenten (Tabel 5.3). Omdat de respons van verschillende suikers in suikerassays enigszins verschillend is, zou het werkelijke suikergehalte in het biosurfactant iets kunnen verschillen van de gevonden waarde. Voor een verdere karakterisering zouden de hoeveelheden van de individuele suikers bepaald moeten worden.

Eiwitbepaling

Om de hoeveelheid eiwit in fractie D te bepalen zijn twee eiwit assays gebruikt: de Bradford en Lowry methoden. Beide methoden geven aan dat het biosurfactant weinig eiwit bevat (ongeveer 5%, Tabel 5.3). Het is niet bekend of het eiwit covalent gebonden is aan het biosurfactant. Beide assays zijn echter niet volledig specifiek voor eiwitten. Het kan daarom mogelijk zijn, dat de respons veroorzaakt werd door niet-specifieke kleuring.

Proteolitische behandeling

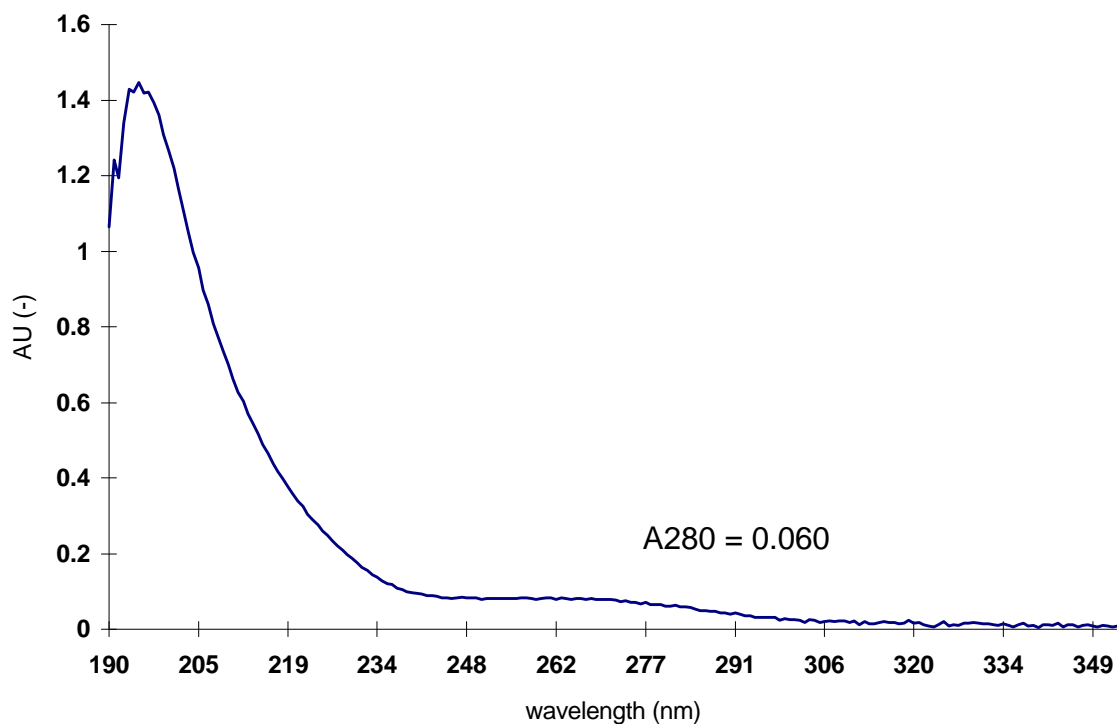
Om te bepalen of het aanwezige eiwit essentieel is voor de emulgerende activiteit, werd het biosurfactant geïncubeerd met protease K [Gibbons & Alexander, 1988]. Protease K is een enzym dat eiwitten hydrolyseert. Na dialyse bleek dat de emulgerende activiteit van de verbinding behouden bleef. Dit toont aan dat het aanwezige eiwit niet essentieel is voor de emulgerende activiteit en wellicht als verontreiniging aanwezig is. Emulsan is als controle meegenomen. Van dit hoogmoleculaire biosurfactant is bekend dat verwijdering van geassocieerd eiwit de emulgerende activiteit vermindert. Behandeling met protease K en dialyse verminderde de activiteit van emulsan significant.

Lipide karakterisering

Na derivatiseren in H_2SO_4 / methanol is het biosurfactant geanalyseerd met GC-MS [Lageveen et al., 1988]. In het biosurfactant zijn geen lipiden gevonden. Op grond van controles met andere biosurfactants en lipiden mag worden aangenomen dat het lipidegehalte in ieder geval kleiner is dan 2%.

UV analyse

Het UV absorptiespectrum van het biosurfactant in fractie D is weergegeven in figuur 5.3. Er is een duidelijke absorptie waarneembaar tussen 240 en 290 nm, golflengten waar aromatische groepen absorberen. Met de vuistregel dat 1 mg/ml eiwit een absorptie bij 280 nm van 1.0 AU geeft, zou het biosurfactant uit 12% eiwit moeten bestaan om de absorptie van 0.060 bij 280 nm te verklaren. Met eiwitbepalingen werd een eiwitconcentratie van rond de 5% gevonden. Dit suggereert dat of het aanwezige eiwit rijk is aan aromatische aminozuren, of dat er nog andere (aromatische) groepen aanwezig zijn.



Figuur 5.3. UV absorptiespectrum van D fractie uit reactor A (0.5 mg/ml, 10 mm cuvet).

HPLC analyse

Het biosurfactant in fractie D en fractie S is met HPLC geanalyseerd om een indruk te krijgen van de zuiverheid van deze fractie. Analyses werden gedaan op twee reversed-phase kolommen (Chromosphere PAH en Nucleosil 10C18) in een water-acetonitrile gradient. Detectie werd gedaan met Evaporative Light Scattering Detectie (ELSD, detecteert niet-selectief alles dat minder vluchtig is dan het eluens) en UV bij 214 nm (peptide bindingen). In alle gevallen werd slechts een piek bij het oplosmiddel-front waargenomen. Deze piek bezat geen emulgerende activiteit. Ook emulsan is bij deze condities niet met HPLC te elueren (eerdere metingen in bij de Vakgroep Biochemie RUG).

Tabel 5.3: Chemische bestanddelen van biosurfactant in fractie D uit effluent reactor A

Componenten	% van biosurfactant
Suikers (D-glucose eenheden)	37-40 % (anthrone methode); 40-44 % (6-deoxyhexose assay)
Eiwit	4-8 % (Lowry); 2-6 % (Bradford)
Vetzuren	niet gedetecteerd

5.4 Discussie en conclusies

De emulgerende activiteit geproduceerd door een culture geïsoleerd van de verontreinigde site wordt vooral teruggevonden in een niet-dialyseerbare fractie van de reactor-effluenten. Het biosurfactant is een witte hoogmoleculaire verbinding met een moleculegewicht groter dan 10 kDa en bestaat voor een groot deel uit suikers (40%). De geïsoleerde emulgerende fractie bevat eiwit (ongeveer 5%). Dit eiwit is echter voor de emulgerende activiteit niet essentieel. Het biosurfactant lijkt geen lipiden te bevatten. Hieruit blijkt dat het biosurfactant een polysaccharide is.

Het is niet aangetoond of het biosurfactant een gedefinieerde verbinding is of bestaat uit meerdere componenten. Maar omdat de emulgerende fractie met HPLC en ammoniumsulfaat precipitatie niet gefractioneerd kon worden, lijkt het in ieder geval om gelijksoortige verbindingen te gaan. Per liter effluent werd 1.2 g biosurfactant geïsoleerd. Dit is vergelijkbaar met de hoeveelheden rhamnolipiden die door *Pseudomonaden* geproduceerd worden en relatief hoog voor hoog-moleculaire biosurfactants zoals emulsan of een lipopeptide van een *Bacillus* stam [Lin et al., 1993].

Vergelijking met andere biosurfactants

Het onderzochte polysaccharide is door haar moleculegewicht en lipidegehalte duidelijk verschillend van glycolipiden zoals rhamnolipiden, trehaloselipiden of sophorolipiden. Laagmoleculaire biosurfactants zijn bij de gebruikte condities vaak met HPLC te detecteren [eigen waarnemingen; Davila et al., 1993], het hier gekarakteriseerde biosurfactant echter niet.

Veel hoogmoleculaire biosurfactants zijn complexen die bestaan uit lipiden, eiwitten en sacchariden [Reddy et al., 1983; Shul'Ga et al., 1990; Goswami et al., 1994; Phale et al., 1995]. In tegenstelling tot het gevonden biosurfactant is het eiwitgedeelte vaak essentieel voor de emulgerende activiteit [Reddy et al., 1983; Gibbons & Alexander, 1988; Wasko & Bratt, 1991]. Een biosurfactant met vergelijkbare hoeveelheden suiker en eiwit als het hier gekarakteriseerde biosurfactant is bekend [Hwang, 1994]. Dit biosurfactant is in tegenstelling tot het hier onderzochte biosurfactant op TLC te detecteren. Het door Rosenberg et al. [1988] geïsoleerde biodispersan lijkt in veel opzichten op het hier gekarakteriseerde biosurfactant (chemische bestanddelen, precipitatie bij 60% ammoniumsulfaat verzadiging). Echter, biodispersan bezit geen emulgerende eigenschappen. Emulsan is een hoogmoleculair polysaccharide dat wat betreft een aantal fysische eigenschappen op het geïsoleerde biosurfactant lijkt. Emulsan verschilt van het geïsoleerde polysaccharide doordat het significante hoeveelheden lipiden en meer eiwit bevat [Zuckerberg et al., 1979]. Verder precipiteert emulsan al bij 35% ammoniumsulfaat. Ook wordt de emulgerende activiteit bij verwijdering van het eiwit [Zuckerberg et al., 1979] en bij behandeling met Protease K significant verminderd. Het gevonden biosurfactant bevat geen lipiden. Er zijn biosurfactants bekend die uit sacchariden en eiwit bestaan, geen lipiden bevatten maar wel emulgerende activiteit bezitten [Cirigliano & Carman, 1985]. Lipiden zijn dus niet noodzakelijk voor emulgerende werking.

Het gekarakteriseerde biosurfactant behoort tot de klasse van hoogmoleculaire biosurfactants. Het heeft overeenkomsten met veel biosurfactants die in de literatuur zijn gerapporteerd. Er is in de literatuur echter geen biosurfactant gevonden waarvan alle eigenschappen met de eigenschappen van het in dit project geproduceerde biosurfactant overeenkomen.

Implicaties voor de toepassing van het biosurfactant bij in situ biologische saneringen

Voor een succesvolle toepassing van een biosurfactant bij bodemsanering moet het biosurfactant ten eerste de verontreiniging solubiliseren of emulgeren en ten tweede zelf bij transport door de bodem mobiel zijn. Het polysaccharide biosurfactant heeft goede emulgerende eigenschappen. De verlaging van de oppervlaktespanning door het biosurfactant is niet groot. Voor goede emulgerende eigenschappen is dit (en een lage CMC) ook niet noodzakelijk. Gezien deze eigenschappen wordt verwacht dat het biosurfactant succesvol kan zijn om verwijdering van NAPLs uit de bodem te stimuleren. Het hoge moleculegewicht van het biosurfactant zou door een 'size exclusion' effect (uitsluiting uit kleine poriën) kunnen zorgen voor een sneller transport door de bodem. Dit mechanisme is waargenomen bij DOC transport [Magee et al., 1991]. Deze vergrote mobiliteit is gunstig voor de functie van transportversnellend agens. Wat het effect hiervan is op verwijdering van NAPLs uit poriën is vooralsnog onbekend. Het feit dat het biosurfactant met HPLC onder bovenstaande condities niet te elueren was, zou veroorzaakt kunnen worden door sterke sorptie aan de matrix. De retentietijd op een reversed-phase kolom is vaak gerelateerd aan de hydrofobiciteit van de verbinding en positief gecorreleerd met de sorptie van een verbinding aan de bodem. Dit zou duiden op een lage mobiliteit. In fase IIb zal de mobiliteit van het biosurfactant verder onderzocht worden.

HOOFDSTUK 6 ALGEMENE DISCUSSIE EN CONCLUSIES

Het doel van de eerste fase was het optimaliseren van de biosurfactant-productie tijdens de afbraak van minerale olie door mengcultures. Voor aanvang van het project is een doelstelling geformuleerd is het produceren van een biosurfactant-oplossing met een oppervlaktespanning kleiner dan 45 mN/m in combinatie met een CMD groter dan 3, óf van een biosurfactant-oplossing met een EMA groter dan 10.

Validatie olie-analyse

Het is gebleken dat de aanwezigheid van biosurfactants (rhamnolipiden en tijdens de reactor-experimenten geproduceerde biosurfactants) de analyse van minerale olie in waterige monsters verstoort. De oorzaak hiervoor is dat tijdens de extractie-stap het extractiemiddel (hexaan) wordt geëmulgeerd. De emulgering kan echter met eenvoudige voorbehandelingen worden voorkomen. Bij monsters met rhamnolipiden heft het aanzuren van het monster tot pH = 2 en het toevoegen van NaCl de emulgerende werking van de biosurfactants op, waardoor de minerale olie analyse betrouwbare resultaten oplevert.

De tijdens het project door mengcultures geproduceerde biosurfactants hebben andere eigenschappen dan rhamnolipiden en het bleek dat bij deze biosurfactants de verstoring van de olie-analyse kon worden opgeheven door voorafgaand aan de extractie de monsters met NaOH op pH = 12 te brengen.

Batch-experimenten

In de batch-experimenten is gebleken dat het mogelijk is de productie van biosurfactants tijdens de afbraak van minerale olie door mengcultures te stimuleren. Het type en de concentratie van de koolstofbron hebben een duidelijke invloed op de productie van oppervlakte-actieve stoffen. De van de verontreinigde lokatie afkomstige olie-achtige drijfslag bleek de meest geschikte koolstofbron te zijn. Toevoeging van glycerol en zonnebloemolie als extra koolstofbron leidde tot een verdere verhoging van de productie van oppervlakte-actieve stoffen. Hiermee werd in de batchgewijze experimenten aan de gestelde eisen voldaan.

Reactor-experimenten

Ook bij de afbraak van minerale olie in reactoren is een duidelijke productie van biosurfactants waargenomen. De aanwezigheid van voldoende zuurstof is hierbij een belangrijke factor. Het toevoegen van zonnebloemolie had een gunstig effect op zowel de olie-afbraak als op de productie van biosurfactants.

Onder de beste omstandigheden lag de oppervlaktespanning van de effluënten echter niet lager dan 40-45 mN/m, terwijl de waarde van de CMD in vrijwel alle gevallen 1 was. De doelstelling op basis van oppervlaktespanning wordt dus niet bereikt. Dit kan verklaard worden door het type biosurfactant dat werd geproduceerd. Het gebruiken van slecht in water oplosbare vloeibare substraten, zoals de drijfslagolie en zonnebloemolie, is een selectie-criterium voor organismen die verbindingen produceren die de organische fase emulgeren. Deze bio-emulsifiers hebben over het algemeen minder sterke oppervlakte-actieve eigenschappen dan bv. de rhamnolipiden die door *Pseudomonas*-stammen worden geproduceerd onder stikstoflimitatie [Falatko & Novak 1992]. Daarom is de emulgerende activiteit in dit geval een betere maat voor de biosurfactant-productie.

De vooraf gestelde doelstelling voor de emulgerende activiteit is gebaseerd op bepaling ervan via de EMA-methode. Hierbij wordt het monster gecentrifugeerd, waarna aan het supernatant een kleine hoeveelheid van een organische vloeistof wordt toegevoegd. Na intensieve menging en een rustperiode wordt de EMA bepaald door de optische dichtheid van het monster te

bepalen. Bij de effluenten van de reactoren bleek het echter meestal niet mogelijk door centrifugeren een helder supernatant te krijgen. Hierdoor zijn de resultaten van de EMA-bepalingen niet betrouwbaar. Andere methoden om een helder effluent te krijgen bleken niet te voldoen. Als alternatieve methode om de emulgerende activiteit te bepalen is daarom de E_{24} -methode gebruikt. Hierbij wordt aan supernatant van het effluent een gelijk volume van een organische fase toegevoegd, waarna intensief wordt gemengd. Na 24 h wordt de E_{24} bepaald als het percentage van de vloeistof dat in de emulsielaag aanwezig is. Als organische fase is hierbij gebruik gemaakt van de olie van de verontreinigde site. Een voorbeeld van de bepaling van de E_{24} is te zien in Figuur 4.7. Het voordeel van de E_{24} -methode is dat er een directe maat voor het gewenste effect (emulgering van de verontreiniging) wordt verkregen. Nadelen zijn dat, omdat de methode minder gebruikt wordt, het moeilijker is de gevonden waarden met die uit de literatuur te vergelijken en dat de doelstelling niet gedefinieerd is op basis van de E_{24} -methode.

Figuur 6.1: Bepaling van de emulgerende activiteit m.b.v de E_{24} -methode. De linker buis is een blanco, de andere buizen zijn effluent-monsters. De E_{24} van de rechter buis is 60%.

Het gebruik van de E_{24} methode is beschreven in een aantal wetenschappelijke publikaties [Banat 1993, Iqbal *et al* 1995, Marin *et al.* 1996]. In het eerste artikel wordt voor een bio-emulsifier, geproduceerd door een *Bacillus sp.* tijdens groei op glucose en een mengsel van olie-achtige verbindingen, een E_{24} van 80-90% gevonden. De tweede publikatie beschrijft de productie van bio-emulsifiers door een genetisch gemodificeerde *Pseudomonas* stam tijdens groei op heptadecaan. Hiermee werd in batch cultures in 6 dagen tijd een E_{24} van 60-80% gehaald. In het laatste artikel wordt bij de groei van een *Acinetobacter calcoaceticus* stam op *n*-tetradecaan een E_{24} van maximaal 40-80% bereikt voor verschillende organische fasen. De in dit onderzoek gevonden E_{24} -waarden van 60-80%, bereikt door het kweken van mengcultures op een mengsel van minerale olie en zonnebloemolie, zijn dus goed vergelijkbaar met waarden die in de literatuur gevonden worden met reincultures van biosurfactant-producerende micro-organismen. Omdat dit ook het uitgangspunt voor het opstellen van de oorspronkelijke doelstelling was, kan geconcludeerd worden dat de

resultaten aanleiding geven om door te gaan met fase II van het project, waarin het effect van de geproduceerde surfactants op de mobilisatie van olie zal worden onderzocht.

Karakterisering van de geproduceerde biosurfactants

De emulgerende activiteit blijkt voornamelijk veroorzaakt te worden door een hoogmoleculaire verbinding met een moleculegewicht groter dan 10 kDa. Deze witte verbinding is rijk aan suikers. Het bevat 40% D-glucose equivalenten. De verbinding bevat weinig eiwit. Omdat na incubatie met protease K en dialyse de emulgerende activiteit van de verbinding behouden bleef, werd de conclusie getrokken dat het aanwezige eiwit niet essentieel is voor de emulgerende activiteit. Met GC-MS analyses werden geen lipiden gevonden. De verbinding is niet goed oplosbaar in ethanol. Op grond van bovenstaande waarnemingen wordt geconcludeerd dat het biosurfactant een polysaccharide is. Per liter effluent werd 1.2 gram van dit polysaccharide biosurfactant geïsoleerd. De emulgerende werking ervan is goed vergelijkbaar met die van andere bio-emulsifiers.

Consequenties voor de praktijk

Uit de reactor-experimenten is gebleken dat het optimale systeem om de biosurfactants te produceren bestaat uit een fed batch systeem waaraan een mengsel van olie van het verontreinigde terrein en zonnebloemolie wordt toegevoerd. Olie van het verontreinigde terrein is in de praktijk meestal eenvoudig te verkrijgen uit de olie/water scheider. Zonnebloemolie is een goedkoop en onschadelijk additief dat bij de analyse van minerale olie niet storend werkt.

Een fed batch systeem is in de praktijk niet bruikbaar voor grondwaterzuivering. Dit betekent dat de productie van biosurfactants niet plaats zal vinden in de reactor waarmee het opgepompte grondwater wordt gezuiverd, maar in een aparte reactor. Het volume van de reactor is dan niet afhankelijk van het grondwaterzuiveringsstelsel, en kan worden gedimensioneerd aan de hand van de hoeveelheid olie in de drijfslag die moet worden geëmulgeerd. Een schatting hiervan kan worden gemaakt na afloop van fase II, waarin op laboratoriumschaal het effect van de geproduceerde biosurfactants op de mobilisatie van de olie wordt onderzocht.

LITERATUUR

- Banat I.M. (1993) The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 15:591-594.
- Chandrasekaran, E.V. & BeMiller, J.N. (1980) Constituent analysis of glycoaminoglycans, in *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. VIII pp. 89-96,, .
- Cirigliano, M.C. & Carman, G.M. (1985) Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 846-850.
- Cooper, D.G. & Goldenberg, B.G. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 224-229.
- Davila, A.M., Marchal, R., Monin, N. & Vandecasteele, J.P. (1993) Identification and determination of individual sophorolipids in fermentation products by gradient elution high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Journal of Chromatography* 648, 139-149.
- De Smet, M.J. (1982) A biotechnological approach to the synthesis of epoxides. Bioconversion of hydrocarbons by *Pseudomonas oleovorans* during growth in a multiphase system. Ph.D. Dissertation, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
- Desai J.D., & A.J. Desai (1993) Production of biosurfactants. In: Kosaric N.(ed) *Biosurfactants*, Marcel Dekker, Inc., New York, USA. p 65-97
- Falatko D.M. & J.T. Novak (1992) Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environ. Res.* 64:163-169.
- Gibbons, J.A. & Alexander, M. (1988) Microbial degradation of sparingly soluble organic compounds: phthalate esters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 283-291.
- Goswami, P., Hazarika, A.K. & Singh, H.D. (1994) Hydrocarbon pseudosolubilizing and emulsifying proteins produced by *Pseudomonas cepacia* N1. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77, 28-31.
- Hodge, J.E. & Hofreiter, B.T. (1962) Determination of reducing sugars and carbohydrates. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1, 380-394.
- Hwang, W.I. (1994) Studies on the recovery and properties of biosurfactant from *Geotrichum candidum*. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society* 32, 449-456.
- Iqbal S., Z.M. Khalid, & K.A. Malik (1995) Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:176-179.
- Kates, M. (1972) *Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids*, North-Holland publishing company, Amsterdam.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. & Witholt, B. (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2924-2932.
- Lin, S.C., Sharma, M.M. & Georgiou, G. (1993) Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Biotechnology Progress* 9, 138-145.
- Magee, B.R., Lion, L.W. & Lemley, A.T. (1991) Transport of Dissolved Organic Macromolecules and their Effect on the Transport of Phenanthrene in Porous Media. *Environ. Sci. Technol.* 25, 323-331.
- Marin M., A. Pedregosa, & F. Laborda (1996) Emulsifier production and microscopical study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:660-667.
- Phale, P.S., Savithri, H.S., Rao, N.A. & Vaidyanathan, C.S. (1995) Production of biosurfactant "Biosur-Pm" by *Pseudomonas maltophilia* CSV89: Characterization and role in hydrocarbon uptake. *Archives of Microbiology* 163, 424-431.

- Pruthi V. & S.S. Cameotra (1995) Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation. *Biotechnol. Technique* 9:271-276.
- Reddy, P.G., Singh, H.D., Pathak, M.G., Bhagat, S.D. & Baruah, J.N. (1983) Isolation and functional characterization of hydrocarbon emulsifying and solubilizing factors produced by a *Pseudomonas* species. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 387.
- Rosenberg, E. (1986) Microbial surfactants. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 3, 109-131.
- Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Legman, R. & Ron, E.Z. (1988) Production of Biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 323-326.
- Shul'Ga, A.N., Eliseev, S.A., Karpenko, E.V., Kirchiv, A.R. & Turovskii, A.A. (1990) Bioemulsifier, produced by *Bacillus* species and its properties. *Mikrobiologicheskii Zhurnal (Kiev)* 52, 78-82.
- Van Dyke M.I., S.L. Gulley, H. Lee, & J.T. Trevors (1993) Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil *J. Ind. Microbiol.* 11:163-170.
- Volkering F. (1996) Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. PhD Thesis Wageningen Agricultural University.
- Volkering F. & A.F.M. Van Velsen (1996) On site productie van biosurfactants bij *in situ* biologische bodemreiniging. NOBIS project 95-1-09, Rapport fase I.
- Wasko M.P. & Bratt, R.P. (1991) Properties of a biosurfactant produced by the fuel contaminant *Ochrobactrum anthropii*. *International Biodeterioration* 27, 265-274.
- Zuckerberg A., Diver A., Peeri Z., Gutnick D.L. & E. Rosenberg (1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 414.

BIJLAGE A: GEDETAILLEERDE RESULTATEN BATCH-EXPERIMENTEN

Laagste waarden voor de oppervlaktespanning is gemeten bij de onderstreepte concentraties

Variabele: primaire koolstofbron

stikstofbron = 30 mM ammoniumchloride, fosfaatbron en buffer = 50 mM fosfaat

Primaire koolstofbron	Concentratie	Laagst gemeten oppervlaktespanning (mN/m)	CMD
DL (drijfllaagolie)	0.67, 1.33, 3.33, <u>6.67</u> ml/L	44	2.5
Dieselolie	0.67, 3.33, <u>6.67</u> ml/L	52	-
Glucose	0.67, 5.00, 10.0 g/L	55	-
Zonnebloemolie	1.33, <u>3.33</u> ml/L	46	1-2
Glycerol	0.67, 5.00, <u>10.0</u> g/L	52	-
Hexadecaan	0.67, 1.33, <u>3.33</u> , 6.67 ml/L	62	-

Variabele: stikstofbron

koolstofbron = 1.33 ml/L DL, P-bron en buffer = 50 mM fosfaat

Stikstofbron	Concentratie [mmol N/L]	Laagst gemeten oppervlaktespanning (mN/m)	CMD
Ammoniumchloride (NH ₄ Cl)	0, 7.5, 15.0, <u>30</u> , <u>90</u>	44	2.5
Kaliumnitraat (KNO ₃)	0, 15, <u>30</u> , <u>90</u>	48	-
Ureum (NH ₂ (CO)NH ₂)	0, <u>30</u>	48	-

Variabele: fosfaatconcentratie / toevoeging *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

stikstofbron = 30 mM ammoniumchloride, buffer = 50 mM TRIS

Koolstofbron	Fosfaat concentratie (mM)	Laagst gemeten oppervlaktespanning (mN/m) / CMD	
		zonder <i>Pseudomonas</i> ATCC 9027	met <i>Pseudomonas</i> ATCC 9027
DL 3.33 ml/L	-	59 / -	N.D.
DL 3.33 ml/L	2	57 / -	57 / -
DL 3.33 ml/L	10	55 / -	58 / -
DL 3.33 ml/L + glucose 5 g/L	10	49 / -	50 / -
DL 3.33 ml/L	20	45 / 2	46 / 1.5
DL 3.33 ml/L	50	44 / 2.5	44 / 2
DL 3.33 ml/L	100	44 / 2	45 / 1.5

Variabele: secundaire koolstofbron

stikstofbron = 30 mM ammoniumchloride, P-bron + buffer = 50 mM fosfaat

Primaire koolstofbron	Secundaire koolstofbron	Laagst gemeten oppervlaktespanning (mN/m)	CMD
DL 0.67, 1.33, 3.33 ml/L	Glucose 1.67, 5, 10 g/L	58	-
	glycerol 1.67, 5, 10 g/L	39	1-1.5

	Dieselolie 0.67, 1.33, 1.67, 3.33 ml/L	54	-
	Hexaan 1.33, 3.33 ml/L	54	-
	Octaan 1.33, 3.33 ml/L	57	-
	Decaan 1.33, 3.33 ml/L	56	-
	Undecaan 1.33, 3.33 ml/L	56	-
	Dodecaan 1.33, 3.33	59	-
	Tridecaan 1.33, 3.33 ml/L	59	-
	Hexadecaan 1.33, 3.33 ml/L	59	-
	Zonnebloemolie 1.33, 3.33 ml/L	41	5
	Acetaat 1.33, 3.33 g/L	56	-
	Ethanol 1.33, 3.33 g/L	55	-
	Aceton 1.33, 3.33 g/L	48	1-1.5
Dieselolie 1.33 ml/L	Glucose 1.33 g/L	60	-
	Glycerol 1.33 g/L	65	-
	Undecaan 1.33 ml/L	60	-
Hexadecaan 1.33 ml/L	Glucose 5, 10 g/L	64	-
	glycerol 5, 10 g/L	67	-