

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE  
BILTHOVEN

Rapport nr. 728603005

Biodegradatie van chloorfenolen in de bodem.

P.H.C. Weijnen, R. v.d. Berg en S. v.d. Berg

mei 1989

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Directoraat Generaal  
Milieubeheer; Directie Drinkwater, Water en Bodem; Hoofdafdeling Bodem.

VERZENDLIJST

- 1 -3 Hoofd van de Hoofdafdeling Bodem van het Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Drinkwater, Water en Bodem.
- 4 Secretaris-Generaal van het Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur.
- 5 Directeur-Generaal Milieubeheer van het Ministerie van Volksgezondheid, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.
- 6 Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer van het Ministerie van Volksgezondheid, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.
- 7 Projectcoördinator DGM/DWB/Bo Dr. J. Willems
- 8 Directie RIVM.
- 9 Ir. N.D. van Egmond.
- 10 Dr. Ir. T. Schneider.
- 11 Ir. F. Langeweg.
- 12 Dr. Ir. C. van den Akker.
- 13 Ir. W. Cramer.
- 14 Projectleider Dr. Ir. J.P.G. Loch.
- 15-20 Leden van de projectgroep.
- 21-23 Auteurs.
- 24-30 Medewerkers LBG.
- 31-32 LBG/SGO.
- 33-34 Bureau Rapporten- en projectenregistratie.
- 35-75 Reserve.

INHOUDSOPGAVE.

	PAG
VERZENDLIJST.....	ii
INHOUDSOPGAVE.....	iii
SUMMARY.....	v
SAMENVATTING.....	vi
1 INLEIDING.....	1
2 LITERATUUR.....	3
3 MATERIAAL EN METHODEN.....	8
3.1 GRONDSOORTEN.....	8
3.2 CHLOORFENOLEN.....	9
3.3 ANALYTISCHE PROCEDURES.....	10
3.3.1 Incubatie.....	10
3.3.2 Extractie.....	11
3.3.3 <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> -analyse.....	11
3.3.4 Destructie.....	12
3.4 ANALYSE METHODEN.....	13
3.4.1 Chloorfenolanalyse ongelabeld.....	13
3.4.2 Chloorfenolanalyse gelabeld.....	14
4 UITVOERING EXPERIMENTEN.....	15
4.1 ANALYTISCH ONDERZOEK.....	15
4.2 BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN (ONGELABELD).....	16
4.2.1 Rolde kort.....	16
4.2.2 Rolde lang.....	16
4.2.3 Totaal experiment.....	17
4.3 ERVARINGSEXPERIMENTEN GELABELD.....	18
4.4 BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN ( <sup>14</sup> C-GELABELD).....	18
5 RESULTATEN.....	21
5.1 ANALYTISCH ONDERZOEK.....	21
5.2 BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN (ONGELABELD).....	21

5.2.1 Rolde kort.....	21
5.2.2 Rolde lang.....	22
5.2.3 Totaal experiment.....	22
5.3 ERVARINGSEXPERIMENTEN GELABELD.....	23
5.4 BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN ( <sup>14</sup> C-GELABELD).....	24
6 DISCUSSIE.....	56
6.1 ANALYTISCH ONDERZOEK.....	56
6.2 BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN (ONGELABELD).....	56
6.2.1 Rolde kort.....	56
6.2.2 Rolde lang.....	56
6.2.3 Totaal experiment.....	58
6.3 ERVARINGSEXPERIMENTEN GELABELD.....	60
6.4 BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN ( <sup>14</sup> C-GELABELD).....	60
7 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN.....	64
LITERATUURLIJST.....	65
BIJLAGEN.....	67

## SUMMARY

Experimental research has been performed to study the behaviour of chlorophenols in soil. The aim was the quantification of both biodegradation and formation of soil bound residue.

The change in concentration of chlorophenols in soil under different conditions has been investigated in time. Under both anaerobic and sterile conditions no significant decrease in chlorophenol concentrations could be observed. Under these conditions no biodegradation or soil bound residue occur. Under aerobic conditions the concentration of chlorophenols decreased in time, indicating biodegradation. The rate of decrease is dependent on the soil type and the chlorophenol isomer. The order of increasing persistence of chlorophenols is 4-MCP < 3-MCP < PCP < 2,3,4,6-TeCP < 3,4-DCP < 2,4,5-TCP. The order of the tested soils with increasing persistence of chlorophenols is: Maasdijk (pH 7.4; O.C. 1.8 %) < Rolde (pH 6.0; O.C. 3.3 %) < Kootwijk (pH 4.2; O.C. 2.2 %) < Katwijk (pH 8.8; O.C. 0.3 %). Research with <sup>14</sup>C-labelled chlorophenols showed that only 20 % of the transformed chlorophenols were recovered as CO<sub>2</sub>. Complete mineralisation does not occur. The remaining activity was found in both waterphase and solid phase, but quantification of these was not possible. Possibly, as a consequence of the biodegradation, formation of soil bound residue does occur. Unfortunately, it was not possible to make a complete massbalance, including possible intermediates.

### SAMENVATTING.

In dit onderzoek zijn laboratoriumexperimenten uitgevoerd om het gedrag van chloorfenolen in de grond nader te bestuderen. Het doel was onderscheid te kunnen maken tussen gebonden residuvorming en biodegradatie en een massabalans op te stellen.

De afname van de chloorfenolconcentratie in de tijd bij incubatie met grond onder verschillende omstandigheden is onderzocht. Onder steriele en anaerobe condities blijken de concentraties van chloorfenolen niet af te nemen. Onder deze omstandigheden vindt dus geen biodegradatie en gebonden residu vorming plaats. Onder aerobe omstandigheden vindt wel een afname van de concentraties chloorfenolen plaats, waarschijnlijk door biodegradatie. De snelheid van afname wordt beïnvloed door de gebruikte grondsoort en het type chloorfenol. De reeks van chloorfenolen in volgorde met toenemende persistentie is: 4-MCF < 3-MCF < PCF < 2,3,4,6-TeCF < 3,4-DCF < 2,4,5-TCF. De reeks van de geteste gronden met toenemende persistentie voor chloorfenolen is : Maasdijk (pH 7,4; O.C. 1,8 %) < Rolde (pH 6,0; O.C. 3,3 %) < Kootwijk (pH 4,2; O.C. 2,2 %) < Katwijk (pH 8,8; O.C. 0,3 %).

Uit onderzoek met <sup>14</sup>C-gelabelde chloorfenolen bleek dat slechts 20 % van de omgezette chloorfenolen werd teruggevonden als CO<sub>2</sub>. Dit betekent dat geen volledige mineralisatie optreedt. De rest van de activiteit was verdeeld over de waterfase en de vaste fase. Deze verdeling kon nog niet gekwantificeerd worden. Mogelijk treedt wel vorming van gebonden residuen op, maar alleen als gevolg van biologische omzetting, en kan gevaar voor uitspoeling van intermediairen bestaan. Het was helaas nog niet mogelijk om een volledige massabalans, inclusief mogelijke metabolieten, op te stellen.

## HOOFDSTUK 1: INLEIDING

Het uitgevoerde onderzoek is een onderdeel van het project "Onderzoek naar het gedrag van chloorfenolen in de bodem" (projectnr. 728603). Het doel van het project is als volgt geformuleerd: Het verkrijgen van inzicht in het gedrag van gechloteerde fenolen in bodem en grondwater, teneinde het gevaar van uitspoeling naar het grondwater en bedreiging van het drinkwater o.a. in gronden met variërende gehalten aan kalk en organische stof te kunnen beoordelen.

Voor de uitvoering van dit project zijn een aantal deelprojecten geformuleerd. Deze deelprojecten zijn:

- onderzoek naar sorptie van chloorfenolen
- onderzoek naar bioafbreekbaarheid van chloorfenolen
- modellering van het gedrag van chloorfenolen
- bestudering van het gedrag van chloorfenolen in laboratoriumkolommen met een zestal Nederlandse grondsoorten.

Het deel van dit project dat hier beschreven zal worden, heeft betrekking op de bio-afbreekbaarheid van chloorfenolen in de grond en op de vorming van gebonden residuen, en vormt de uitwerking van met name het deelproject bioafbreekbaarheid. Met gebonden residu wordt bedoeld de stof die na extractie nog aan de vaste fase aanwezig is.

Chloorfenolen komen in het milieu voor als gevolg van het gebruik als houtconserveringsmiddel en als bestrijdingsmiddel. Ook kunnen chloorfenolen afbraakprodukten zijn van pesticiden en zijn het bijprodukten van sommige organische syntheses. In Nederland zijn chloorfenolen aangetoond in oppervlaktewater en in sediment.

De volgende chloorfenolen komen voor op de lijst van "priority pollutants" van de EEG: monochloorfenolen, 2,4-dichloorfenol, trichloorfenolen en pentachloorfenol.

Uit de resultaten van de deelprojecten die al zijn uitgevoerd kan het

volgende geconcludeerd worden over het gedrag van chloorfenolen in de onverzadigde zone:

- chloorfenolen spoelen niet uit, zelfs niet in de meest kwetsbare gronden (laag org.stofgehalte, hoge pH);
- biodegradatie van chloorfenolen vindt plaats, maar of dit mineralisatie betreft is de vraag;
- de verdamping van chloorfenolen is verwaarloosbaar klein;
- reversibele sorptie van chloorfenolen treedt op, maar bleek kwantitatief onbelangrijk in het kolomonderzoek en trad alleen op in de bovenste bodemlaag;
- kolomonderzoek: 85-100 % van de chloorfenolen is 'verdwenen', maar of dit biodegradatie of gebonden residu vorming betreft is niet duidelijk.

Door de vorming van gebonden residuen kan accumulatie in de bodem optreden en in die vorm een gevaar vormen voor de multifunctionaliteit van de bodem. Daarom moet deze gekwantificeerd worden. Het doel van dit deelonderzoek is om biodegradatie en gebonden residu vorming te kwantificeren zodat een massabalans kan worden opgesteld. Tevens wordt onderzocht of de biodegradatie van chloorfenolen mineralisatie betreft of dat intermediairen gevormd worden.

De massabalans voor de chloorfenolen in grond ziet er als volgt uit:

chloorfenolen toegevoegd = chloorfenolen in oplossing (uitspoeling) +  
reversibel gebonden chloorfenolen +  
CO<sub>2</sub> +  
metabolieten +  
chloorfenolen in de gasfase +  
gebonden residu.

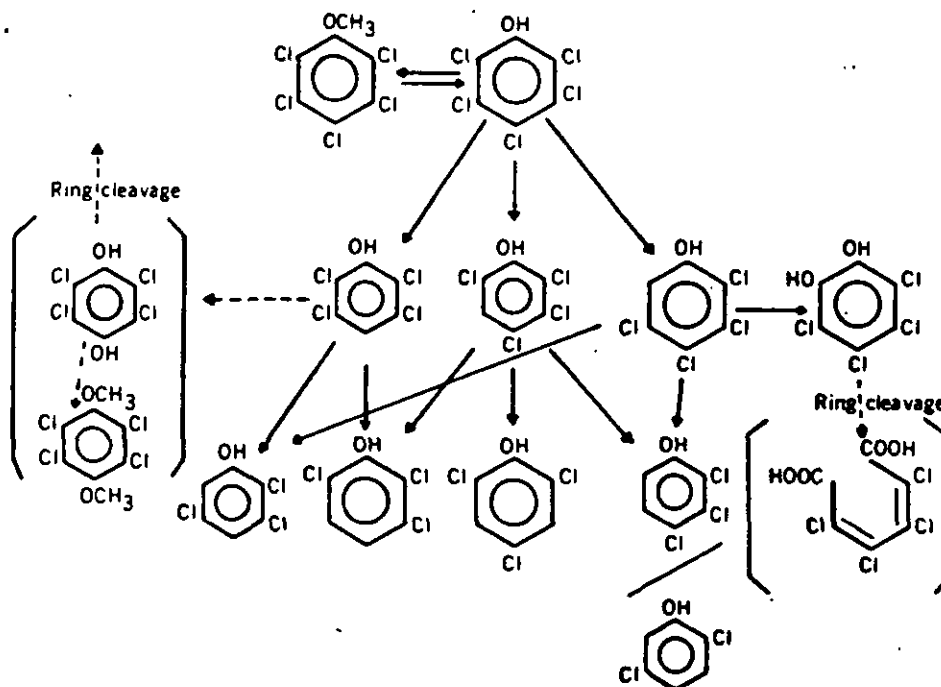
Als men alle termen van de massabalans heeft gekwantificeerd kan men het gedrag van deze verbindingen in de bodem voorspellen en zo komen tot een inschatting van de gevaren die de aanwezigheid van chloorfenolen met zich meebrengt.



## HOOFDSTUK 2: LITERATUUR

De meeste literatuur over de afbraak van chloorfenolen behandelt de degradatie van pentachloorfenol (PCF), terwijl over de andere chloorfenolen veel minder gepubliceerd is. Het meeste onderzoek is verricht naar de biodegradatie onder anaerobe omstandigheden.

Kaufman (1978) heeft een overzicht gegeven van de literatuur over de afbraak van pentachloorfenol. Pentachloorfenol kan door chemische, microbiologische en fotochemische reacties afgebroken worden. De afbraak was in bevloede of anaerobe gronden sneller dan in aerobe gronden. Vele afbraakproducten zijn gevonden in gronden waaraan PCF was toegevoegd. Enkele mogelijke afbraakroutes van PCF onder anaerobe omstandigheden staan weergegeven in figuur 2.1, waarbij de eerste stap methylering of reductieve dechlorering is.



FIGUUR 2.1: Mogelijke afbraakroutes van PCF onder anaerobe omstandigheden (Kaufman, 1978).

Murthy et al (1979) hebben de afbraak van PCF in grond onder aerobe en anaerobe omstandigheden met elkaar vergeleken. Onder aerobe omstandigheden was de verwijdering van pentachloorfenol sneller dan onder anaerobe omstandigheden. Zowel aerob als anaerob werd PCF omgezet in pentachlooranisol en ook werden 2,3,5,6- en 2,3,4,5-TeCF en 2,3,6-TCF als afbraakproducten aangetoond, dus er vond zowel methylering als reductieve dechlorering plaats. Onder aerobe omstandigheden werd meer pentachlooranisol gevormd dan onder anaerobe omstandigheden. Onder anaerobe condities vindt waarschijnlijk dehydrodehalogenatie plaats tot tetra- en trichloorfenolen en minder omzetting tot pentachlooranisol. In anaerobe grond wordt echter ook 42 % van het gevormde pentachlooranisol weer teruggevormd tot PCF, terwijl dit in aerobe grond slechts 6 % was. Dit kan een verklaring zijn waarom men onder aerobe omstandigheden minder pentachlooranisol vond. Ook concluderen zij dat er sterke aanwijzingen zijn dat gebonden residuvorming niet PCF betreft maar dat pentachlooranisol gebonden wordt.

Weiss et al (1982) voegden <sup>14</sup>C-PCF toe aan een bevoeide rijstgrond en onderzochten waar de activiteit van het gelabelde koolstof zich na enige tijd bevond. Na 1 seizoen was nog 36,5 % van de activiteit aanwezig in de bodem terwijl dit na 2 seizoenen 30,1 % was. Van deze activiteit in de grond was het grootste deel niet extraheerbaar met methanol (28,6 van de 36,5 %). 55 % van de activiteit was verdwenen via de gasfase, waarschijnlijk als CO<sub>2</sub>, maar dit is niet bepaald. Slechts 0,5 % werd teruggevonden als onveranderd PCF. De verhouding tussen niet-extraheerbare en extraheerbare residuen in de grond nam het tweede jaar toe. Er werden slechts geringe hoeveelheden intermediären waargenomen. De intermediären duiden er op dat verschillende reactiemechanismen zijn: reductieve dechlorering, methylering, conjugatie en inbouw in onoplosbare macromoleculen.

De conclusie uit dit onderzoek was dat PCF verdwijnt door vervluchtiging (waarschijnlijk mineralisatie, maar dit werd niet bepaald) en door

omzettingsreacties die meestal leiden tot de vorming van onoplosbare residuen in grond. De reductieve dechlorering stopt waarschijnlijk bij drie chlooratomen.

Scheunert et al (1986) beschrijven het gedrag van PCF in een bodem-plant systeem. Ook in dit onderzoek was een groot deel van de activiteit, die in de grond was achtergebleven, niet extraheerbaar. Mineralisatie tot CO<sub>2</sub> en de vorming van niet extraheerbare residuen in de grond was relatief hoger voor lage dan voor hoge concentraties PCF en nam toe met de tijd.

Scheunert (1987) beschrijft het gedrag van 2,4,6-TCF en PCF onder zowel laboratorium- als veldomstandigheden. De resultaten die in laboratoriumexperimenten na een incubatietijd van 1 week zijn gevonden zijn gegeven in tabel 2.1.

Er treedt een vrij snelle afbraak van 2,4,6-TCF op maar tevens worden grote hoeveelheden gebonden residu gevormd. De afbraak van PCF was langzamer, maar er werden veel meer oplosbare metabolieten gevormd. Er is dus een groot verschil in gedrag tussen beide chloorfenolen.

Valo et al (1985) bestudeerden de invloed van verschillende factoren op de biodegradatie van PCF door een gemengde bacteriecultuur. Van toegevoegd PCF werd 60-80 % teruggevonden als CO<sub>2</sub> en 80-90 % van de Cl-atomen werd teruggevonden als vrij Cl<sup>-</sup>. Dit gebeurde binnen 1 week incubatie bij beginconcentraties lager dan 600 µM. Degradatie bleef doorgaan als de O<sub>2</sub> concentratie werd verlaagd tot 0,02 % maar stopte bij een concentratie van 0,002 %. Ook bij een temperatuur beneden 8 °C werd geen biodegradatie gevonden.

De afbraak van verschillende hoger gechloreerde chloorfenolen door *Rhodococcus chlorophenolicus* onder aerobe omstandigheden is beschreven door Apajalahti en Salkinoja-Salonen (1986). De actinomiceet was geïsoleerd uit een cultuur die PCF kon afbreken.

RECOVERIES (%)			
	CO <sub>2</sub>	oplosbare intermediären	gebonden residu
2,4,6-TCF	22	1	61
PCF	10	52	14

Tabel 2.1: Gevonden percentages CO<sub>2</sub>, gebonden residu en oplosbare intermediären na een incubatie van 2,4,6-TCF en PCF met grond onder aerobe omstandigheden gedurende 1 week (Scheunert, 1987).

De volgende chloorfenolen konden worden afgebroken: PCF, 2,3,4,5-, 2,3,4,6-, 2,3,5,6-TeCF, 2,3,4-, 2,3,5-, 2,3,6-, 2,4,6-, 2,4,5-TCF, 2,5- en 2,6-DCF waarbij PCF, de drie tetrachloorfenolen en 2,3,4-, 2,3,5- en 2,3,6-TCF in staat waren de synthese van de benodigde enzymen voor de eigen afbraak op gang te brengen, terwijl 2,4,5-, 2,4,6-TCF, 2,5- en 2,6-DCF alleen werden afgebroken na voorincubatie met PCF. 3,4,5-TCF, 2,3-, 2,4-, 3,4- en 3,5-DCF werden niet afgebroken, ook niet na voorincubatie met PCF. Er werd geen verklaring gegeven voor dit feit. Wel werd aangetoond dat het biodegradatie betrof en dat de enzymen nodig voor de afbraak van chloorfenolen niet permanent aanwezig zijn, maar eerst geïnduceerd moeten worden.

Vonk et al (1981) hebben de afbraak van PCF en 2,4,5-TCF in grond onder aerobe omstandigheden onderzocht. De halfwaardetijden bedroegen in een zandgrond en een zandige leemgrond voor PCF 16 respectievelijk 11 dagen en voor 2,4,5-TCF 11 respectievelijk 8 dagen. Wel dient opgemerkt te

worden dat de afbraak geen eerste orde kinetiek vertoonde zodat eigenlijk geen gebruik gemaakt kan worden van halfwaardetijden. PCF bleek dus persistenter te zijn dan 2,4,5-TCF onder deze omstandigheden. PCF werd in zandige leemgrond binnen 28 dagen voor 30 % omgezet in CO<sub>2</sub>. Tevens werd de vorming van pentachlooranisol en enkele andere niet geïdentificeerde metabolieten waargenomen.

Men kan volgens de literatuur verwachten dat PCF zowel onder aerobe als anaerobe omstandigheden zal afbreken, waarbij de anaerobe condities gunstiger lijken te zijn. Van de overige chloorfenolen is alleen de afbraak van de hoger gechloroerde beschreven en deze zijn ook afbreekbaar. Voor de beschreven chloorfenolen treedt gebonden residu vorming op. Van de mono- en dichloorfenolen is te weinig bekend om te kunnen voorspellen of en in welke mate ze afbreekbaar zijn.

### HOOFDSTUK 3: MATERIAAL EN METHODEN

#### 3.1: GRONDSOORTEN

Voor het biodegradatie-experiment is grond gebruikt afkomstig uit Rolde, Maasdijk, Katwijk en Kootwijk. De grond is genomen uit de bovenste 15 cm van de bodem. De voorbereiding van de gronden bestond uit zeven over een 2,8 mm zeef en homogeniseren door de grond goed om te scheppen. Van deze gronden zijn bepaald: vochtgehalte, organisch stofgehalte, pH en kalkgehalte. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.1.

Grondsoort	vochtgeh.gloeiverlies		pH(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	pH(KCl)
	(%)	(%)		
Maasdijk	5.3	4.4	7.4	7.2
Katwijk	3.7	0.2	8.8	8.4
Kootwijk	6.1	3.6	4.2	3.5
Rolde	18.6	7.7	6.0	5.8

Grondsoort	org.C (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	koloniegetal/mg	
			totaal	CF-afbrekers
Maasdijk	1.8	2.1	1600	860
Katwijk	0.3	1.9	1200	4
Kootwijk	2.2	-	110	48
Rolde	3.3	-	2100	46

Tabel 3.1: Karakterisering van de gebruikte grondsoorten.

De gronden zijn ook microbiologisch gekarakteriseerd door het totale koloniegetal te bepalen en door het koloniegetal van chloorfenolafbrekers te bepalen. Ook deze resultaten zijn gegeven in tabel 3.1.

### 3.2: CHLOORFENOLEN

De samenstelling van de gebruikte chloorfenolenoplossing was niet voor alle experimenten exact gelijk. In principe werd gestreefd naar de volgende samenstelling:

3-monochloorfenol	20 mg/l
4-monochloorfenol	20 mg/l
3,4-dichloorfenol	5 mg/l
2,4,5-trichloorfenol	2 mg/l
2,3,4,6-tetrachloorfenol	1 mg/l
pentachloorfenol	1 mg/l

De chloorfenolen waren opgelost in bidest en verkregen door initiële oplossing in aceton, gevolgd door verdunning in bidest.

Voor de concentraties van de chloorfenolen in de grond als gevolg van de toegepaste additie van 1 ml chloorfenolenoplossing aan 20 gram grond betekend dit een benadering van de volgende eindconcentraties:

3-monochloorfenol	1000 ug/kg
4-monochloorfenol	1000 ug/kg
3,4-dichloorfenol	250 ug/kg
2,4,5-trichloorfenol	100 ug/kg
2,3,4,6-tetrachloorfenol	50 ug/kg
pentachloorfenol	50 ug/kg

Bij experimenten met <sup>14</sup>C-gelabelde verbindingen is het niet gewenst om een cocktail van chloorfenolen in een keer toe te voegen en te meten. Het is beter voor het meten van mineralisatie een chloorfenol tegelijk

toe te voegen. De gevormde producten zijn namelijk niet terug te sporen naar de moederstof. Er zijn experimenten gedaan met <sup>14</sup>C-4-monochloorfenol en met <sup>14</sup>C-3,4-dichloorfenol. Deze chloorfenolen waren uniform gelabeld.

De <sup>14</sup>C-gelabelde chloorfenolen werden gemengd met niet gelabelde chloorfenolen zodat de concentraties voor 4-MCF- en 3,4-DCF-oplossing respectievelijk 20 en 5 mg/l waren en de activiteit voor beide ongeveer 500 Bq/ml.

### 3.3: MEETMETHODEN EN ANALYTISCHE PROCEDURES.

#### 3.3.1: Incubatie.

Van de voorbereekte grond werd 20 gram afgewogen in 100 ml incubatieflesjes die werden afgesloten met een schroefdop met daarin een nieuw septum (butylrubber). De steriele monsters werden twee keer gesteriliseerd m.b.v. een autoclaaf (121 °C) met 3 dagen tussenruimte. De anaerobe monsters werden enkele malen doorgeblazen met helium totdat met de gaschromatograaf geen zuurstof meer werd waargenomen.

Als blanco werd 20 ml bidest genomen i.p.v. 20 gram grond en gesteriliseerd (idem steriele monsters). De verdere behandeling was identiek aan de grondmonsters.

Op tijdstip  $t=0$  werd aan alle flessen 1 ml steriele chloorfenolenoplossing toegevoegd. Dit gebeurde met een steriele injectiespuit door het septum heen. Daarna werden de monsters geïncubeerd bij 10 °C in het donker. Op bepaalde tijdstippen werd voor een aantal monsters de incubatie afgebroken en de grond geëxtraheerd. Van de anaerobe monsters werd eerst de gasfase bemonsterd om te controleren of geen aerobie was opgetreden. De aerobe monsters werden tijdens de incubatie enkele malen geopend om te voorkomen dat ze anaeroob zouden worden.



### 3.3.2: Extractie.

De extractieprocedure voor de analyse van de chloorfenolen was als volgt:

- voeg 40 ml boraxoplossing (18,47 g/l, pH op 13,5 gebracht door toevoeging KOH) toe aan 20 gram grond
- 10 minuten schudden
- 1 uur ultrasoonbad met ijswater
- toevoegen: - 2,7 ml azijnzuuranhydride
  - 20 ml petroleumether
  - 1 ml PCB-155 oplossing (10 mg/l) in petroleumether (interne standaard)
- 10 minuten schudden
- 20 minuten centrifugeren bij ca 2500 rpm.
- petroleumetherfase 10 keer verdunnen en meten m.b.v. een gaschromatograaf

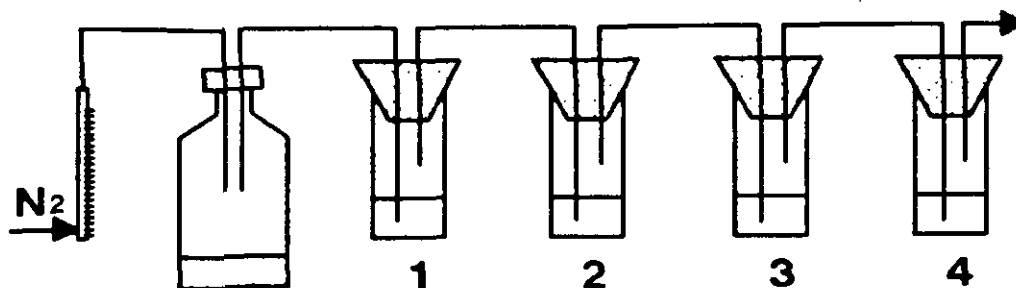
Voor de monsters die met gelabelde chloorfenolen zijn geïncubeerd, verschilde de extractieprocedure op de volgende punten van de hierboven beschreven methode:

- de PCB-155 oplossing werd niet toegevoegd
- na centrifugeren werd 1 ml petroleumetherfase gemengd met 2 ml Instagel en geteld met een vloeistofscintillatieteller.

### 3.3.3: <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-analyse.

Voordat de monsters, die met gelabelde chloorfenolen geïncubeerd waren, geëxtraheerd werden, werd de gasfase doorgeblazen met stikstof en de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> opgevangen om de mineralisatie te kunnen bepalen. Hiervoor werd de opstelling zoals weergegeven in figuur 3.1 gebruikt. De eerste twee flesjes dienden voor het opvangen van vluchtige organische verbindingen en de laatste twee flesjes voor de opvang van CO<sub>2</sub>. De werkwijze was als volgt:

- zet de telpotjes in de opstelling: 1,2; 3 ml hexaan + 7 ml Instagel  
3,4; 8 ml Carbosorb



FIGUUR 3.1: Schematisch overzicht van de gebruikte opstelling voor het meten van  $^{14}\text{CO}_2$ .

- stel de flow in op 100 ml/min.
- plaats de gasinlaat en uitlaat in het monster
- voeg 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  toe aan het monster
- 12 minuten doorblazen
- draai de gaskraan dicht
- verwijder van achter naar voren de telflesjes 4, 3 en 1
- voeg aan de flesjes 3 en 4 twaalf ml Permafluor V toe
- flesje 2 blijft in de opstelling tot na het laatste monster
- flesjes tellen m.b.v. vloeistofscintillatieteller

#### 3.3.4: Destructie.

Om de hoeveelheid gebonden residu te kunnen bepalen zijn een aantal grondmonsters gedestruëerd waarbij  $^{14}\text{CO}_2$  ontstaat dat een maat is voor de hoeveelheid stof in de vorm van activiteit die nog in de grond aanwezig is. De monsters werden eerst volgens de normale werkwijze doorgeblazen om het door mineralisatie gevormde  $\text{CO}_2$  te verwijderen en te meten.

De werkwijze voor de destructie was als volgt:

Een deelmonster van 2 gram werd genomen en in een destructiebuis gedaan.

Hieraan werd 1 gram kaliumbichromaat toegevoegd. Boven in de destructiebuis werd een telflesje met 8 ml Carbosorb geplaatst voor adsorptie van het gevormde  $\text{CO}_2$ . Dan werd 5 ml 60 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  / 40 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  toegevoegd en de buis meteen gesloten. De buis werd gedurende een half uur verwarmd op 160 °C en daarna bleef het een nacht staan om af te koelen. Aan het telflesje werd 12 ml Permafluor V toegevoegd en vervolgens werd de activiteit gemeten.

Voor de destructie van de boraxoplossing werd na het sonificeren een gedeelte van het borax-grond mengsel afgecentrifugeerd en van de bovenstaande vloeistof 2 ml gedestruerd op dezelfde manier als de grond.

### 3.4: ANALYSEMETHODEN.

#### 3.4.1: Chloorfenolanalyse ongelabeld.

Gaschromatograaf : HP 5890  
Kolom : HP fused silica crosslinked 5 % Phe Me silicone  
(lengte 25m, diameter 0,32 mm, filmdikte 0,52 um)  
Detector : ECD (Ni-63)  
Dragergas : Helium  
Injectievolume : 5 ul  
Temperatuurprogramma: 80 °C, 1 min  
3 °C/min tot 290 °C  
290 °C, 10 min.  
Injectortemp. : 210 °C  
Detectortemp. : 300 °C

Om de stabiliteit en de werking van de gaschromatograaf te controleren werd om de 5 monsters een standaard geïnjecteerd. De recoveries van de monsters werd berekend door de verhouding van de piekhoogtes van chloorfenol/interne standaard van de monsters te delen op deze verhouding voor de blanco's. Dus:

RECOVERY =  $\frac{\text{piekh CF}_m}{\text{piekh IS}_m} * \frac{\text{piekh IS}_{bl}}{\text{piekh CF}_{bl}} * 100 \%$ .

CF<sub>m</sub> - chloorfenol in monster  
CF<sub>bl</sub> - chloorfenol in blanco  
IS<sub>m</sub> - interne standaard monster  
IS<sub>bl</sub> - interne standaard blanco

#### 3.4.2: Chloorfenolanalyse gelabeld.

De monsters met gelabelde verbindingen werden gemeten met een Packard 1500 Liquid Scintillation Analyzer. De telling werd uitgevoerd in duplo met een maximale teltijd van 30 minuten. Er werd een correctie toegepast voor de achtergrondstraling. Ook hier werden de recoveries berekend ten opzichte van de gemeten blanco's.

## HOOFDSTUK 4: UITVOERING EXPERIMENTEN.

### 4.1: ANALYTISCH ONDERZOEK.

Bij een eerste experiment, uitgevoerd volgens de methode zoals beschreven in Deul (1987), bleken de recoveries voor chloorfenolen maar 70 % te bedragen. Omdat dit de betrouwbaarheid van de resultaten erg negatief beïnvloedt, is getracht de recoveries te verbeteren door de extractieprocedure aan te passen.

Omdat chloorfenolen boven een bepaalde pH dissociëren en dan beter in de waterfase oplossen, is gekeken of de pH bij de extractie invloed had op de recoveries. De pH tijdens extractie is voor een aantal monsters verhoogd door toevoeging van KOH. Er is geen verlaging van de pH toegepast omdat niet verwacht kon worden dat dit de resultaten zou verbeteren.

De uitvoering van het experiment was als volgt:

Aan 20 gram grond werd 20 ml boraxoplossing toegevoegd en daarna werd KOH toegevoegd zodat er een pH-reeks van 8 tot 12 gemaakt kon worden. Als referentie werd bij de laagste pH geen KOH toegevoegd. Daarna werd chloorfenolenoplossing toegevoegd en werd de extractie verder uitgevoerd volgens voorschrift. Dit experiment is uitgevoerd met zowel steriele als niet-steriele monsters.

Omdat de resultaten na de verhoging van de pH wel verbeterd waren maar nog steeds geen 100 % recovery werd gevonden, is besloten de extractieprocedure verder aan te passen. Dit is gebeurd door de hoeveelheden boraxoplossing en azijnzuuranhydride, die tijdens de extractie worden toegevoegd, te variëren. De geteste hoeveelheden toegevoegde boraxoplossingen zijn: 20, 40 en 60 ml. De hoeveelheden azijnzuuranhydride die toegevoegd zijn: 0,9; 2,7 en 4,5 ml.

Bovenstaande experimenten hebben geleid tot een nieuwe verbeterde extractieprocedure, zoals die is beschreven in hoofdstuk 3.3.2.

#### 4.2: BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN (ONGELABELD).

##### 4.2.1: Rolde kort.

Met de verbeterde analytische procedure is een experiment opgezet waarbij zowel op korte als op langere termijn is gekeken naar de verwijdering (gebonden residu vorming en/of biodegradatie) van chloorfenolen in Rolde grond. Voor het experiment is Rolde grond genomen vanwege het hoge organische stofgehalte en omdat in eerdere experimenten deze grond de meeste problemen opleverde. Het korte termijn experiment (1 dag) had tot doel om te onderzoeken of gebonden residu vorming al binnen deze korte tijd zou optreden (er wordt geen biodegradatie verwacht binnen dit korte tijdsbestek).

Onder gebonden residu vorming wordt hier verstaan de chloorfenolen die na extractie nog aan de vaste fase gebonden zijn. Meestal wordt met gebonden residuvorming bedoeld de hoeveelheid chloorfenolen die na een uitputtende extractie met verschillende organische oplosmiddelen nog aan de vaste fase aanwezig is. De hier gehanteerde definitie van gebonden residu vorming wijkt hiervan dus af.

##### 4.2.2: Rolde lang.

Het lange termijn experiment (100 dagen) had tot doel zowel de gebonden residu vorming als de biodegradatie van de chloorfenolen te onderzoeken. Er is geprobeerd om onderscheid te maken tussen gebonden residu vorming (BRV) en biodegradatie door met steriele en niet-steriele monsters te werken. Bij steriele monsters verwacht men geen biodegradatie, zodat een eventuele afname van de concentratie chloorfenolen is toe te schrijven aan BRV of chemische omzetting. Bij niet steriele monsters kan zowel biodegradatie als BRV optreden. Door aan te nemen dat de BRV en chemische omzetting bij steriele en niet-steriele monsters gelijk zijn kan men de biodegradatie kwantificeren. Het is met deze methode echter niet mogelijk om te beoordelen of de biodegradatie mineralisatie betreft of dat deze slechts gedeeltelijk is en dat er dus intermediairen worden gevormd. Deze intermediairen zouden ook als gebonden residu door

de grond vastgelegd kunnen worden.

De experimenten zijn uitgevoerd met zowel aerobe als anaerobe monsters om de invloed van deze omstandigheden op biodegradatie te onderzoeken en om te bepalen welke groepen van bodemmicroorganismen in staat zijn om chloorfenolen af te breken.

#### 4.2.3: Totaal experiment.

Omdat bovenstaand experiment goed verlopen was en redelijk betrouwbare resultaten opleverde is eenzelfde experiment opgestart maar nu met 4 verschillende grondsoorten: Rolde, Kootwijk, Katwijk en Maasdijk. Dit experiment had tot doel de invloed van verschillende grondsoorten met verschillende organische stof gehalten en verschillende pH's op de biodegradatie van chloorfenolen te onderzoeken. Tevens kan onderzocht worden of een verband bestaat tussen verschillende bodemeigenschappen en de biodegradatie van chloorfenolen. Voor elke grondsoort zijn daarom bepaald: pH, organisch stofgehalte, droge stofgehalte en kalkgehalte. Tevens is gekeken of een verband bestond tussen de afbraak van chloorfenolen en het microbiologische karakter (totaal koloniegetal en het koloniegetal van de chloorfenolafbrekers) van de gronden.

#### 4.3: ERVARINGSEXPERIMENTEN GELABELD.

De extractiemethode, zoals die is ontwikkeld voor niet-gelabelde chloorfenolen is ook getoetst voor gelabeld 4-mono- en 3,4-dichloorfenol. Dit is gebeurd om te controleren of deze methode geschikt was en om ervaring op te doen met het werken met gelabelde verbindingen. De opstelling voor het meten van gelabeld  $\text{CO}_2$  is opgebouwd en getest. De methode om het gevormde  $\text{CO}_2$  op te vangen en vervolgens te meten is ontwikkeld en beschreven door Van Vlaardingen (1988). Deze methode had enkele aanpassingen nodig voordat hij geschikt was voor de hier uitgevoerde experimenten. Er zijn enkele experimenten uitgevoerd met gelabeld bicarbonaat en met gelabeld acetaat om te controleren of alle gevormde  $\text{CO}_2$  ook werd gemeten.

In een eerste experiment werd  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  toegevoegd aan grond, zuur toegevoegd en doorgeblazen. Ter controle werd  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  ook toegevoegd aan Instagel en rechtstreeks gemeten. Met name is aandacht besteed aan de vraag of en hoeveel zuur toegevoegd moet worden om  $\text{CO}_2$  volledig te verwijderen uit de grondmonsters.

Daarna is een experiment gedaan met gelabeld natriumacetaat, waarvan bekend is dat het snel wordt afgebroken in de bodem. Deze incubatie heeft 9 dagen bij 20 °C plaatsgevonden.

De hieruit voortgekomen aangepaste methode is beschreven in hoofdstuk 3.4.3.

#### 4.4: BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN ( $^{14}\text{C}$ -GELABELD).

Om de massabalans te kunnen opstellen en om de biodegradatie beter te kunnen kwantificeren zijn een aantal experimenten uitgevoerd met  $^{14}\text{C}$ -gelabelde chloorfenolen. Het voordeel van het werken met gelabelde verbindingen is dat men het gevormde  $\text{CO}_2$ , dat ook gelabeld is, kan meten. Wanneer men niet met gelabelde verbindingen werkt krijgt men, vooral bij de gehanteerde lage concentraties, interferentie van de



bodemmineralisatie.

Een nadeel van deze methode is dat geen onderscheid gemaakt kan worden tussen de  $\text{CO}_2$  afkomstig van de verschillende chloorfenolen en dat dus voor elk chloorfenol een apart experiment uitgevoerd moet worden. Naast de bepaling van het gevormde  $\text{CO}_2$  wordt ook het extraheerbaar gehalte aan chloorfenolen bepaald.

Een eerste experiment is uitgevoerd met  $^{14}\text{C}$ -gelabeld 4-monochloorfenol omdat in het biodegradatieëxperiment met ongelabelde verbindingen was gebleken dat deze chloorfenol snel afbreekt. Omdat ook was gebleken dat onder aneroobe omstandigheden geen significante afname van chloorfenolen plaatsvond, zijn bij dit experiment alleen aerobe en steriele monsters geïncubeerd.

Het tweede experiment werd ingezet met gelabeld 3,4-dichloorfenol, maar minder frequent bemonsterd omdat uit ongelabeld onderzoek was gebleken dat de afbraak hiervan veel langzamer was dan van monochloorfenol. De frequentie van monsternamen was dus afhankelijk van de afbraakkinetiek zoals ervaren in ongelabelde experimenten.

Omdat tijdens deze experimenten bleek dat slechts een beperkt gedeelte van de verwijderde chloorfenolen als  $\text{CO}_2$  teruggevonden werd en dat de massabalans dus niet klopte is getracht toch 100 % recovery te bereiken door de activiteit van de boraxoplossing en de grond te meten door destructie en het hierbij gevormde  $\text{CO}_2$  op te vangen en ook hiervan de activiteit te meten.

Van de monsters met  $^{14}\text{C}$ -gelabeld 4-monochloorfenol, die 44 dagen geïncubeerd waren, werd na het doorblazen 2 gram grond afgewogen en gedestruëerd. Van de monsters na 41 dagen incubatie met  $^{14}\text{C}$ -gelabeld 3,4-dichloorfenol gebeurde hetzelfde, maar werd tevens het grond-borax mengsel afgecentrifugeerd en de boraxoplossing gedestruëerd om onderscheid te kunnen maken tussen oplosbare en niet oplosbare gelabelde verbindingen die tijdens de afbraak gevormd zijn.

In een experiment met 4 grondsoorten (Rolde, Kootwijk, Maasdijk en

Katwijk) is getest of de gevonden produktie van  $\text{CO}_2$  uit 4-monochloorfenol specifiek was voor Rolde grond of dat dit bij elke grondsoort gelijk is. Hiervoor zijn monsters geïncubeerd en op dag 0 en dag 10 geanalyseerd.

Om meer specifieke aanwijzingen te krijgen over waar de activiteit zich nu bevindt zijn nog een aantal experimenten uitgevoerd met 3,4-dichloorfenol monsters, die 50 dagen geïncubeerd waren.

Getest is of de activiteit die in de boraxoplossing aanwezig was niet voor een deel bestond uit bicarbonaat of opgelost  $\text{CO}_2$ . Bij het testen van de opstelling voor het meten van  $\text{CO}_2$  met  $\text{NaHCO}_3$  en acetaat was wel gebleken dat alle gevormde  $\text{CO}_2$  verwijderd werd, maar dit zou mogelijk bij de afbraak van chloorfenolen anders kunnen zijn.

Een monster werd eerst volgens de beschreven methode doorgeblazen en daarna werd zoveel  $4\text{ N H}_2\text{SO}_4$  toegevoegd dat een suspensie ontstond. Deze suspensie werd doorborreld met stikstof om er zeker van te zijn dat alle  $\text{CO}_2$  verwijderd zou worden.

De overige monsters zijn volgens voorschrift geëxtraheerd waarbij van de aerobe monsters twee keer, namelijk na het sonificeren en op het einde van de extractie, een gedeelte is afgecentrifugeerd en zowel de boraxoplossing als de vaste fase (na afgieten van de bovenstaande vloeistof) is gedestruëerd.

## HOOFDSTUK 5: RESULTATEN.

### 5.1: ANALYTISCH ONDERZOEK.

De resultaten van het experiment waarbij de pH tijdens de extractie is gevarieerd zijn weergegeven in de figuren 5.1 t/m 5.4. Het blijkt dat de pH van invloed is op de recoveries van chloorfenolen. Een optimale pH voor de extractie van chloorfenolen blijkt 12 te zijn. Daarom is besloten bij de verdere experimenten met deze pH te werken. De recoveries bleken voor deze pH nog steeds geen 100 % te bedragen, maar waren wel duidelijk verbeterd. Dit is weergegeven in tabel 5.1, die de recoveries weergeeft van de extracties bij pH 12.

De resultaten van het experiment waarbij de hoeveelheden toegevoegde boraxoplossing en azijnzuuranhydride werden gevarieerd zijn weergegeven in tabel 5.2. Het experiment was in duplo uitgevoerd. De recoveries zijn nu ongeveer 100 %, behalve voor pentachloorfenol, waarvan de recoveries duidelijk lager liggen. Besloten is om de hoeveelheid boraxoplossing te verhogen van 20 tot 40 ml en de hoeveelheid azijnzuuranhydride te verhogen van 0,9 naar 2,7 ml. Om te controleren of deze nieuwe extractieprocedure beter is werd de extractie nog eens herhaald en de resultaten hiervan zijn weergegeven in tabel 5.3. De resultaten van deze extractie zijn bevredigend zodat werd besloten deze nieuwe methode te gebruiken en geen tijd meer te steken in een verdere verbetering van de extractiemethode.

### 5.2: BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN (ONGELABELD).

#### 5.2.1: Rolde kort.

De resultaten van het korte experiment met Rolde grond zijn weergegeven in de figuren 5.5 t/m 5.7. Het blijkt dat tijdens de eerste dag geen afname van de concentraties chloorfenolen plaatsvond, ongeacht de

conditie van incubatie (aeroob, anaeroob of steriel).

#### 5.2.2: Rolde lang.

De resultaten van het experiment met 100 dagen incubatie van Rolde grond met chloorfenolen zijn weergegeven in de figuren 5.8 t/m 5.10. Voor de steriele monsters blijkt geen afname van de concentraties chloorfenolen op te treden.

Bij de aerobe monsters wordt een duidelijke afname van de concentraties aan chloorfenolen waargenomen.

De afname verschilt aanzienlijk tussen de verschillende chloorfenolen. Het snelst afbreekbaar is 4-monochloorfenol, dat na 14 dagen helemaal verdwenen is. 3-monochloorfenol is na ongeveer 40 dagen geheel verdwenen. Daarna lijkt dichloorfenol het beste afbreekbaar, gevolgd door tetra- en pentachloorfenol. Trichloorfenol blijkt in Rolde-grond onder aerobe omstandigheden het slechtst afbreekbaar.

Onder anaerobe omstandigheden vindt geen significante afname van de chloorfenolenconcentraties plaats. Enkele monsters bleken bij controle niet meer anaeroob te zijn en de resultaten van deze monsters zijn daarom weggelaten in figuur 5.9. De zuurstofconcentratie in de gasfase van de anaerobe monsters zijn weergegeven in de bijlage.

#### 5.2.3: Totaal experiment.

De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in de figuren 5.11 t/m 5.16. Tevens zijn in tabel 5.4 de halfwaardetijden gegeven die met een eerste orde model (v.d. Berg, 1989) zijn berekend. Het model berekent de duur van de lagfase en de halfwaardetijd. Er werd alleen een lagfase gevonden bij aerobe incubatie met Rolde grond voor 3-mono-, di- en trichloorfenol van 3, 19 en 38 dagen, respectievelijk, maar het was twijfelachtig of hier van een echte lagfase sprake was. Voor de overige experimenten werden geen lagfasen vastgesteld. Het blijkt dat onder anaerobe en steriele omstandigheden er geen of slechts geringe verwijdering van chloorfenolen plaatsvindt, terwijl onder aerobe omstandigheden, afhankelijk van het chloorfenol en de grondsoort, een

duidelijk afname van de chloorfenolconcentraties optreedt.

Er zijn duidelijke verschillen in het gedrag van chloorfenolen in verschillende gronden. Het minst persistent onder aerobe omstandigheden zijn de chloorfenolen in Maasdijk grond en het meest persistent in Katwijk grond. In alle gronden is 4-MCF het minst persistent en 2,4,5-TCF in drie van de vier gronden het meest persistent (behalve in Katwijk grond).

Van de anaerobe monsters blijkt 4-MCF in een groot aantal monsters afgebroken te zijn. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van zuurstof in deze monsters. Vanwege de geringe persistentie van 4-MCF is afbraak het eerst bij 4-MCF te constateren. Dat de afbraak waarschijnlijk wordt veroorzaakt door zuurstof blijkt als de samenstelling van de gasfase van de monsters bekeken wordt. De aanwezigheid van of het verbruik van zuurstof kan aan de stikstofconcentraties worden geconstateerd.

Zuurstof wordt namelijk verbruikt en als op het tijdstip van monsternamen geen zuurstof werd waargenomen betekent dit niet dat geen zuurstof aanwezig is geweest. Stikstof wordt niet opgenomen en als stikstof aanwezig is betekent dit dat er ook zuurstof aanwezig moet zijn geweest. De monsters waar geen of zeer lage stikstofconcentraties werden gevonden blijken geen afbraak van chloorfenolen te vertonen, wijzend op anaerobe persistentie.

### 5.3: ERVARINGSEXPERIMENTEN GELABELD.

Als eerste experiment met gelabelde verbindingen is een recovery-experiment op de analytische procedure uitgevoerd, zowel met 4-mono- als met 3,4-dichloorfenol. De recoveries bleken voor beide chloorfenolen tussen de 89 en 95 % te liggen (zie tabel 5.5). Dit komt overeen met de waarden gevonden voor niet-gelabelde chloorfenolen. De extractieprocedure kan dus ook voor gelabelde verbindingen gebruikt worden.

De resultaten van het experiment met gelabeld natriumbicarbonaat, dat door aanzuren werd omgezet in  $\text{CO}_2$ , hetgeen vervolgens werd opgevangen en gemeten, zijn weergegeven in tabel 5.6. De recoveries zijn rond de 100 %, alleen voor de watermonsters is de recovery duidelijk lager. Een mogelijke oorzaak hiervan is dat de monsters niet verwarmd werden waardoor waarschijnlijk niet alle  $\text{CO}_2$  uit de waterfase verwijderd is. De recoveries voor de grondmonsters zijn wel zodanig, dat de methode zo gebruikt zou kunnen worden. Een nadeel was echter dat een gedeelte van de activiteit in het tweede Carbosorb flesje (fles 4) werd teruggevonden. Het is niet meer te achterhalen van welk monster of welke monsters deze activiteit afkomstig was. Daarom werd besloten om in de volgende experimenten 8 ml Carbosorb i.p.v. 4 ml in de spoelflesjes te gebruiken.

De resultaten van het experiment met gelabeld acetaat zijn weergegeven in tabel 5.7. Toevoeging van 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lijkt de recoveries te verhogen. Er wordt geen activiteit waargenomen in de hexaan/instagel flesjes, echter wel weer in de tweede carbosorb flesjes. Toevoeging van meer  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en langer flushen lijken beide de recoveries verder te verhogen, echter de spreiding is in beide experimenten erg groot, waardoor de interpretatie van deze resultaten bemoeilijkt wordt. De procedure is aangepast voor de in deze experimenten gebruikte monsters en is weergegeven in hoofdstuk 3.4.3.

#### 5.4: BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN (<sup>14</sup>C-GELABELD).

Er zijn experimenten uitgevoerd met 2 gelabelde chloorfenolen, nl. 4-monochloorfenol en 3,4-dichloorfenol in Rolde grond. Van deze chloorfenolen is de afbraak gevolgd als de vorming van gelabeld  $\text{CO}_2$ . De resultaten van beide experimenten zijn weergegeven in de figuren 5.17 t/m 5.20 en tabel 5.8 en 5.9. 4-Monochloorfenol is na 14 dagen bijna geheel verdwenen, terwijl ongeveer 20 % van de activiteit wordt

teruggevonden als  $\text{CO}_2$ . 3,4-Dichloorfenol blijkt sneller af te breken dan in het ongelabelde experiment. Ook hier wordt slechts een klein gedeelte van de afgebroken chloorfenolen teruggevonden als  $\text{CO}_2$  (10 %). Bij de gemeten steriele monsters werd, zoals verwacht, geen gelabeld  $\text{CO}_2$  waargenomen, hetgeen een aanwijzing is voor het ontbreken van microbiologische activiteit in deze monsters.

De resultaten van de destructies van grond geïncubeerd met 4-MCF en 3,4-DCF gedurende resp. 44 en 41 dagen zijn weergegeven in tabel 5.10. Bij de interpretatie van deze resultaten dient er rekening mee gehouden te worden dat de destructiemethode op dit tijdstip nog geen 100 % recoveries gaf en nog verder geoptimaliseerd moest worden. Men moet de resultaten dus zien als kwalitatieve aanwijzingen van waar de activiteit zich bevindt. Ook dient rekening te worden gehouden dat de resultaten beïnvloed zijn door het nemen van deelmonsters.

De 4-monochloorfenol monsters zijn direct gedestruëerd zonder voorafgaande extractie (na de verwijdering van  $\text{CO}_2$ ). Er zijn ook blanco monsters gedestruëerd. De destructie voldeed nog niet goed, daarom zijn de recoveries berekend ten opzichte van de blanco's. De som van de activiteit van de  $\text{CO}_2$  productie en de activiteit gemeten bij de destructie is gemiddeld ongeveer 100 % van de toegevoegde activiteit.

De resultaten van de destructie van de gronden, die met 3,4-dichloorfenol onder aerobe omstandigheden zijn geïncubeerd, zijn minder duidelijk. Mogelijk heeft het nemen van deelmonsters voor de destructie invloed op de resultaten, ook gezien de grote spreiding die optreedt. Bij dit experiment werd van elk monster namelijk maar een deelmonster gedestruëerd terwijl bij 4-monochloorfenol telkens twee deelmonsters gedestruëerd werden.

Van de hoeveelheid activiteit die bij de met 3,4-dichloorfenol geïncubeerde monsters in de boraxoplossing werd gevonden is ongeveer 10 % (van de toegevoegde activiteit) afkomstig van niet afgebroken

chloorfenolen. De massabalans voor 3,4-dichloorfenol zou er dan als volgt uitzien:

3,4-dichloorfenol	ca. 10 %
CO <sub>2</sub>	ca. 10 %
in boraxopl. oplosbare metabolieten	ca. 40 %
gebonden residu	ca. 40 %

3,4-Dichloorfenol is een som van chloorfenolen in oplossing en reversibel gebonden chloorfenolen. Gebonden residu bestaat waarschijnlijk uit niet extraheerbare metabolieten. Rekening dient te worden gehouden met het feit dat de destructiemethode nog niet goed functioneerde. Bovenstaande massabalans is daarom alleen een eerste kwalitatieve schatting.

De resultaten van het experiment met vier grondsoorten die met 4-monochloorfenol zijn geïncubeerd zijn weergegeven in tabel 5.11. Aangezien voor alle vier de grondsoorten de recoveries op dag 0 voor de chloorfenolen ongeveer 100 % waren en op dat tijdstip geen CO<sub>2</sub> werd gevonden zijn alleen de resultaten van dag 10 weergegeven.

Een beperkte hoeveelheid CO<sub>2</sub>, namelijk 0,4 %, werd gevonden bij een experiment waarbij een met 3,4-dichloorfenol geïncubeerd monster na het flushen verder werd aangezuurd totdat er een suspensie ontstond. Men kan dus stellen dat met de gebruikte methode vrijwel alle geproduceerde CO<sub>2</sub> verwijderd wordt uit de grondmonsters.

De resultaten van de destructies van monsters die 50 dagen met 3,4-DCF geïncubeerd waren zijn weergegeven in tabel 5.12. De recoveries zijn berekend ten opzichte van de activiteit van de petroleumetherfase in de blanco's. De recoveries zijn beduidend lager dan in het vorige experiment, maar dit wordt veroorzaakt door de lage efficiëntie van de destructie. De resultaten moeten dus niet gezien worden als absolute getallen.



RECOVERIES (%)						
CONDITIE	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	2,4,5-TRI	2,3,4,6-TETRA	PENTA
NIET ST	76	69	69	79	83	79
STERIEL	94	84	74	87	80	78

TABEL 5.1: Percentages recovery van de toegevoegde chloorfenolen bij extractie van steriele en niet-steriele Rolde grond. Methode Deul (1987) bij pH 12.

RECOVERIES (%)							
Borax (ml)	AA (ml)	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	2,4,5-TRI	2,3,4,6-TETRA	PENTA
20	0.9	98	94	100	108	105	94
20	2.7	91	89	92	95	82	67
40	0.9	94	94	100	106	-	-
40	2.7	100	97	102	107	91	75
40	4.5	99	93	102	104	90	75
60	2.7	103	100	112	119	110	117
60	4.5	101	97	107	106	94	80

Tabel 5.2: De percentages recovery van chloorfenolen bij extractie van niet-steriele Rolde grond bij pH 12 met verschillende hoeveelheden boraxoplossing en azijnzuuranhydride (AA).

---

RECOVERIES (%)						
CONDITIE	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	2,4,5-TRI	2,3,4,6-TETRA	PENTA
NIET-ST	90	91	99	106	91	85
NIET-ST	96	94	106	113	98	91
STERIEL	95	94	101	93	92	73

---

Tabel 5.3: Percentages recovery van chloorfenolen bij extractie van steriele en niet-steriele Rolde grond met de verbeterde extractieprocedure (pH 12, 40 ml boraxoplossing en 2,7 ml azijnzuuranhydride toegevoegd)

---

RECOVERIES (%)		
CONDITIE	4-MONO	3,4-DI
NIET-ST	95	91
NIET-ST	89	90
STERIEL	95	91

---

Tabel 5.5: Percentages recovery van gelabelde chloorfenolen bij extracties van Rolde grond op t = 0, zowel steriel als niet-steriel, gemeten als de recovery van de activiteit in de petroleumetherfase.

GRONDSOORT CONDITIE		HALFWAARDETIJD (DAGEN)					
		3-MONO	4-MONO	DI	TRI	TETRA	PENTA
ROLDE	AEROOB	8	2	16	29	32	30
KOOTWIJK	AEROOB	43	6	> 100	> 100	> 100	73
MAASDIJK	AEROOB	6	< 1	24	37	35	28
KATWIJK	AEROOB	82	18	44	> 100	>> 100	>> 100
ROLDE	ANAEROOB	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
KOOTWIJK	ANAEROOB	>> 100	73	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100
MAASDIJK	ANAEROOB	> 100	> 100	> 100	>> 100	>> 100	>> 100
KATWIJK	ANAEROOB	> 100	> 100	> 100	>> 100	>> 100	>> 100
ROLDE	STERIEL	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100
KOOTWIJK	STERIEL	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100
MAASDIJK	STERIEL	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100
KATWIJK	STERIEL	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100	>> 100

Tabel 5.4: Halfwaardetijden van de experimenten met vier verschillende gronden berekend met een eerste orde model.

MEDIUM	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	RECOVERIES (%)
GROND	0,5	114
WATER	0,5	65
GROND	1,0	101

Tabel 5.6: Recoveries van gemeten <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, gevormd door het aanzuren met verschillende hoeveelheden H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> van NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>, dat was toegevoegd aan Rolde grond cq bidest.

TIJD (min)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	ACTIVITEIT (Bq)
12	0	123
12	1	132
12	*	149
50	0	139

\* Zo veel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> toegevoegd, dat er net een suspensie ontstond.

Tabel 5.7: Invloed van de tijdsduur van doorblazen en van de hoeveelheid toegevoegd H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> op de gemeten activiteit van het gevormde <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ontstaan door afbraak van gelabeld acetaat na negen dagen incubatie met Rolde grond.

MONSTER	TIJD (dag)	AEROOB		STERIEL	
		REC-CF (%)	REC-CO <sub>2</sub> (%)	REC-CF (%)	REC-CO <sub>2</sub> (%)
1	0	83.26	0.02		0.15
2	0	77.17	0.53	98.54	0.00
3	0	90.20	0.20	95.94	0.05
4	1	63.47	1.35	95.16	0.01
5	1	72.36	0.88	92.79	
6	1	70.18	1.78	93.13	
7	3	49.43	0.18	95.63	0.00
8	3	60.30	4.04	96.77	
9	3	62.54	4.14	99.72	
10	7	39.52	9.01	94.61	0.03
11	7	4.33	19.93	95.33	
12	7	39.60	9.25	94.72	
13	10	6.47	20.47	96.09	0.03
14	10	25.41	13.86	98.53	
15	10	23.20	7.50	95.78	
16	14	3.74	23.30	95.17	0.01
17	14	4.59	20.90	97.31	
18	14	3.51	22.51	93.13	
19	21	3.27	21.86	99.04	0.03
20	21	4.82	16.31	90.77	
21	21	2.87		100.24	
22	44	4.48	17.42	89.85	0.02
23	44	4.49	17.59	92.65	0.02

Tabel 5.8: Afbraak van gelabeld 4-monochloorfenol en de vorming van gelabeld CO<sub>2</sub> in Rolde grond. Percentages recovery ten opzichte van de toegevoegde hoeveelheid activiteit.

MONSTER	TIJD (dag)	AEROOB		STERIEL	
		REC-CF (%)	REC-CO <sub>2</sub> (%)	REC-CF (%)	REC-CO <sub>2</sub> (%)
1	0	87.27	0.03		0.01
2	0	89.32	0.03	95.37	0.01
3	0	86.44	0.03	95.38	0.01
4	3	82.71	0.95	93.66	0.00
5	3	83.75	0.92	93.79	
6	3	81.93	0.88	91.74	
7	7	71.79	2.00	91.44	0.01
8	7	75.15	1.95	93.08	
9	7	70.59	1.30	92.72	
10	14	39.74	4.51	92.68	0.01
11	14	49.92	3.75	91.84	
12	14	34.46	2.65	90.78	
13	22	22.81	9.31	97.04	0.01
14	22	21.17	9.88	91.96	
15	22	29.91	8.40	92.86	
16	27	18.10		83.36	0.01
17	27	15.07	11.08	80.49	
18	27	15.66	10.79	80.72	
19	41	11.22			0.02
20	41	10.63	12.45	94.68	
21	41	11.56	13.91	93.46	

Tabel 5.9: Afbraak van gelabeld 3,4-dichloorfenol en de vorming van gelabeld CO<sub>2</sub> in Rolde grond. Percentages recovery ten opzichte van de toegevoegde hoeveelheid activiteit.

CONDITIE	RECOVERIES (%)			
	CF	CO <sub>2</sub>	DES * GROND	DES * BORAX
MCF AE	4.5	17.4	85.5	
	4.5	17.6	76.3	
ST	89.9	0.0	97.3	
	92.7	0.0	92.0	
DCF AE	10.6	12.4	77.7	54.8
	11.6	13.9	111.0	48.0
	11.2		114.0	
ST	94.7	0.0	95.5	
	93.5	0.0	97.3	

\*DES GROND= destructie grond (CF + extr. metabolieten + gebonden residu)  
 DES BORAX= destructie borax (CF + extr. metabolieten).

Tabel 5.10: Recoveries van de destructies van de vaste fase en de boraxoplossing van met 3,4-dichloorfenol en 4-monochloorfenol geïncubeerde Rolde grond na 44 respectievelijk 41 dagen.

GRONDSOORT	REC-CF (%)	REC-CO <sub>2</sub> (%)
KATWIJK	27.56	2.18
	27.98	1.77
	23.97	2.51
ROLDE	4.68	16.68
	4.16	20.05
	4.39	17.86
MAASDIJK	2.19	14.68
	2.17	15.19
	2.35	15.07
KOOTWIJK	2.54	15.44
	2.60	15.73
	2.79	16.00

Tabel 5.11: Recoveries van de gelabeld 4-MCF en het gevormde CO<sub>2</sub> na 10 dagen incubatie in vier verschillende grondsoorten.



CONDITIE	CO <sub>2</sub>	CF	RECOVERIES (%)			
			GR 1	GR 2	B 1	B 2
AE	15.1	12.4	NB	36.4	28.8	7.0
	13.9	13.4	15.1	20.5	32.8	6.7
	8.2	10.5	NB	19.3	NB	6.8

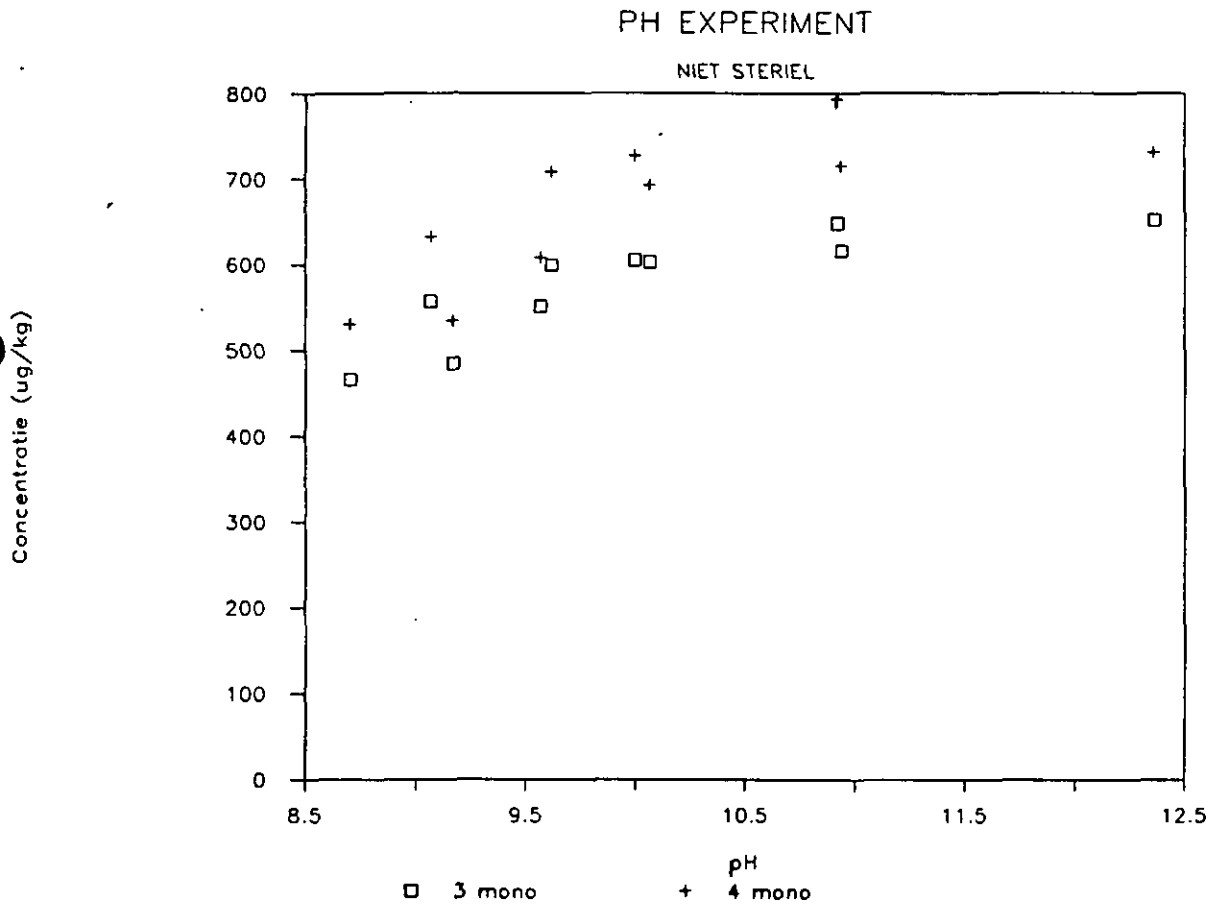
GR 1- destructie grond na sonificatie (BRV)

GR 2- destructie grond op einde extractieprocedure (BRV)

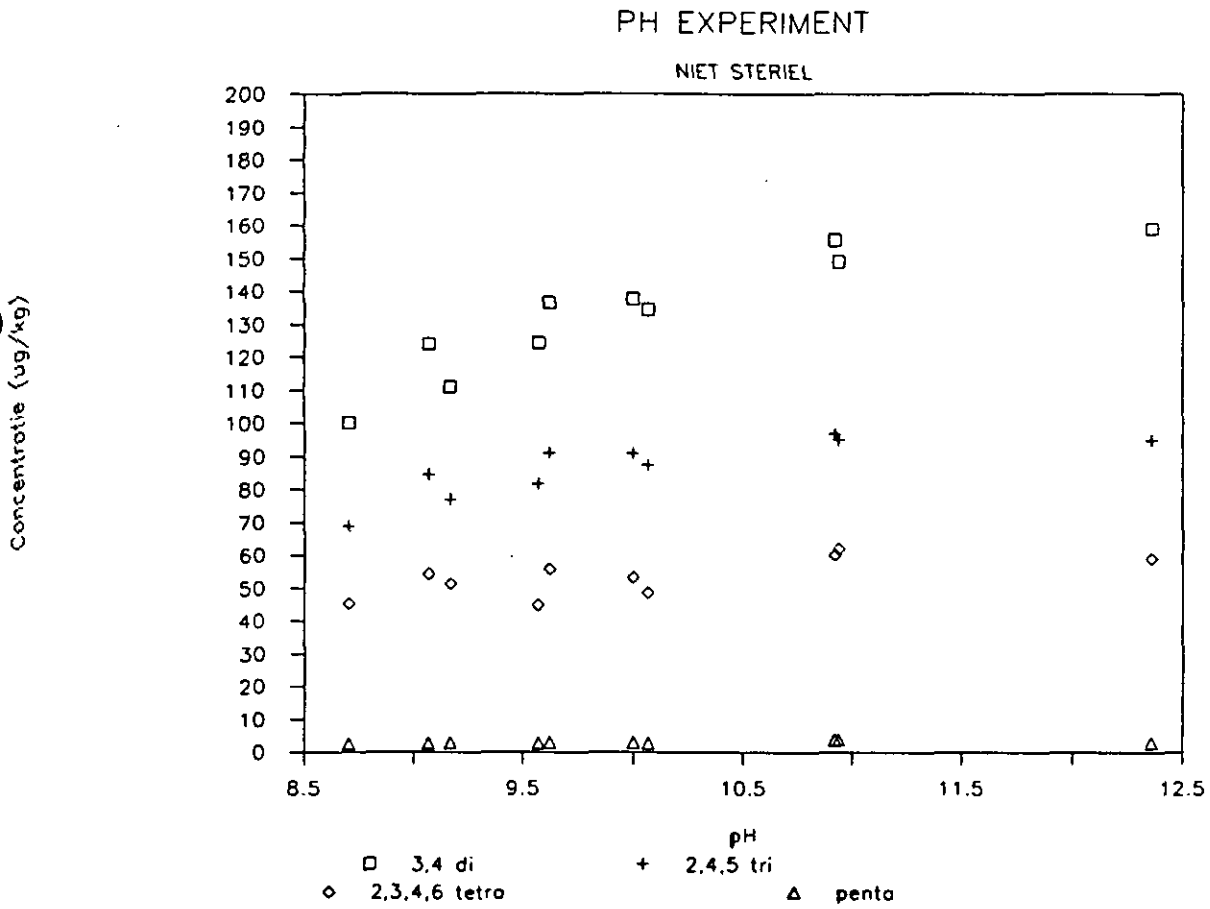
B 1 - destructie borax na sonificatie (extr. metabolieten + CF)

B 2 - destructie borax op einde extractieprocedure (extr. metabolieten)

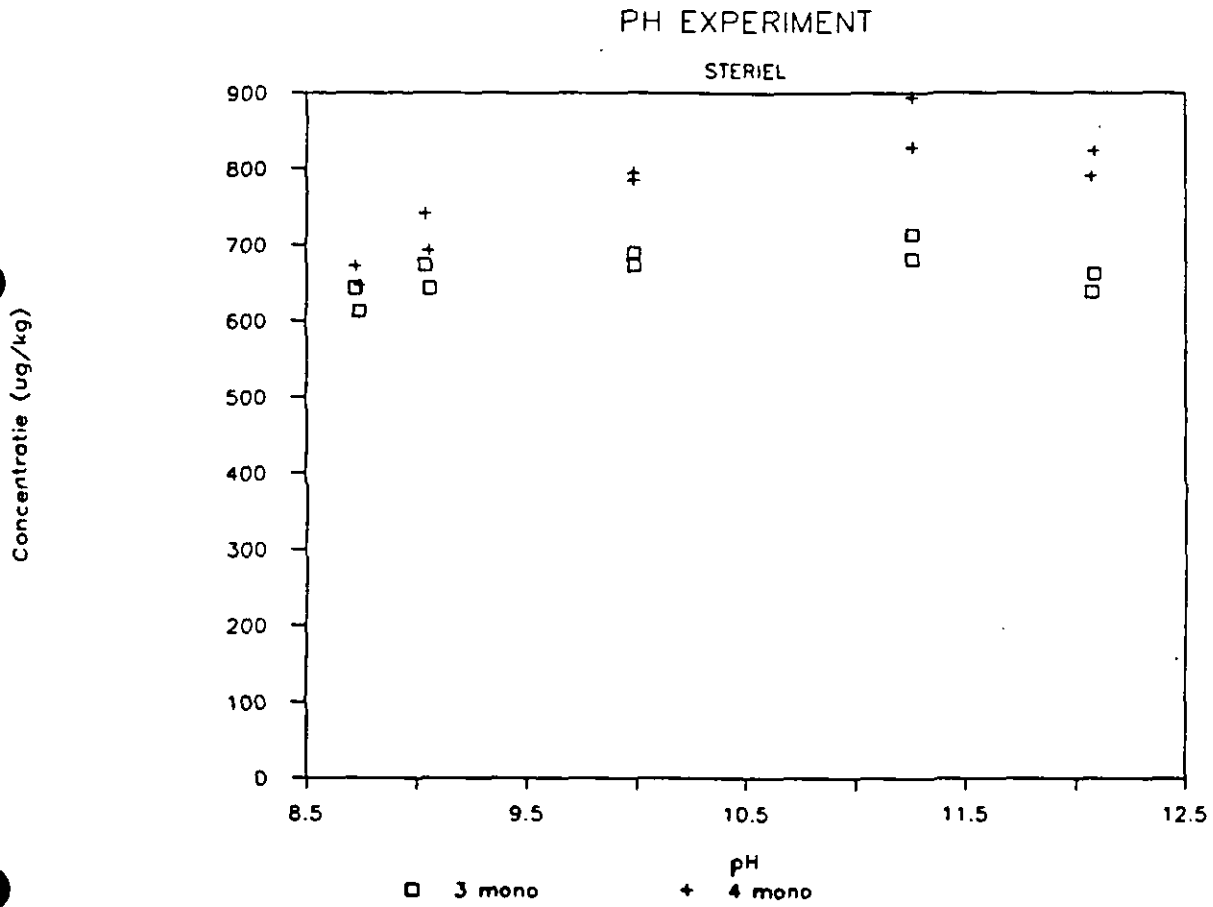
Tabel 5.12: Recoveries van de destructie van de boraxoplossing en de vaste fase van monsters met Rolde grond die 50 dagen met 3,4-dichloorfenol zijn geïncubeerd.



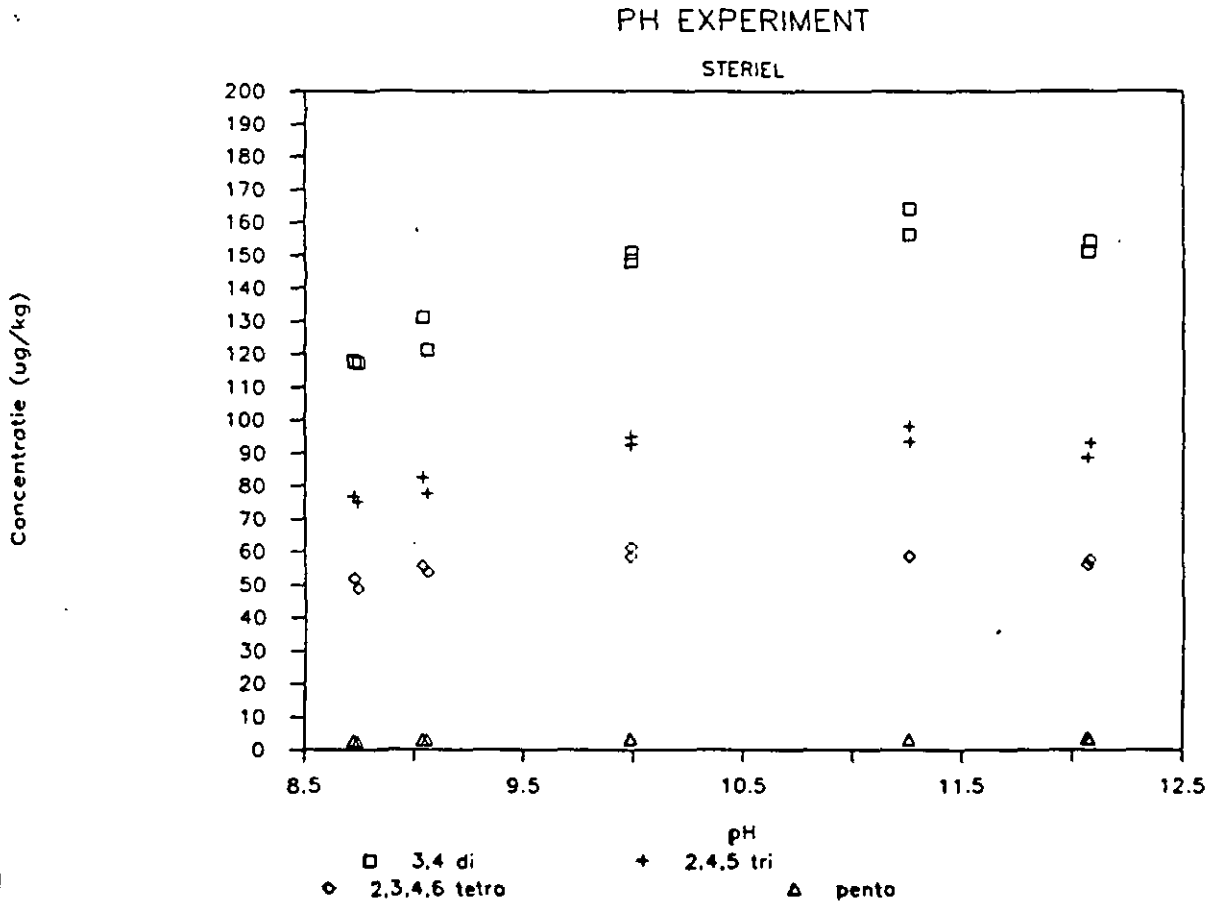
FIGUUR 5.1: Verband tussen de pH van het grond-borax mengsel en de gevonden concentraties van 3- en 4-monochloorfenol bij extractie van niet-steriele Rolde-grond (C niet bekend).



FIGUUR 5.2: Verband tussen de pH van het grond-borax mengsel en de gevonden concentraties van 3,4-di-; 2,4,5-tri-; 2,3,4,6-tetra- en pentachloorfenol bij extractie van niet-steriele Rolde grond (C<sub>0</sub> niet bekend).



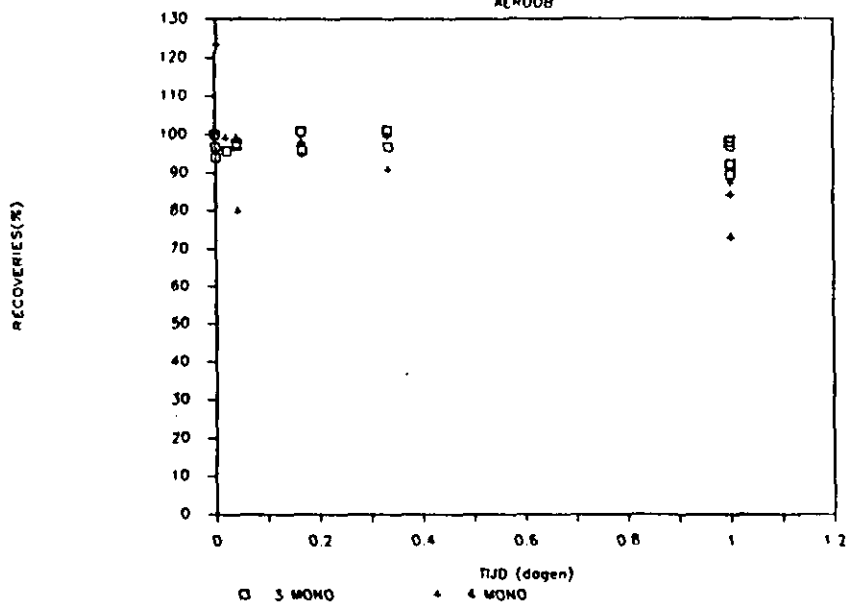
FIGUUR 5.3: Verband tussen de pH van het grond-borax mengsel en de gevonden concentraties van 3- en 4-monochloorfenol bij extractie van steriele Rolde grond (C niet bekend).



FIGUUR 5.4: Verband tussen de pH van het grond-borax mengsel en de gevonden concentraties van 3,4-di-; 2,4,5-tri-; 2,3,4,6-tetra- en pentachloorfenol bij extractie van steriele Rolde grond (C niet bekend).

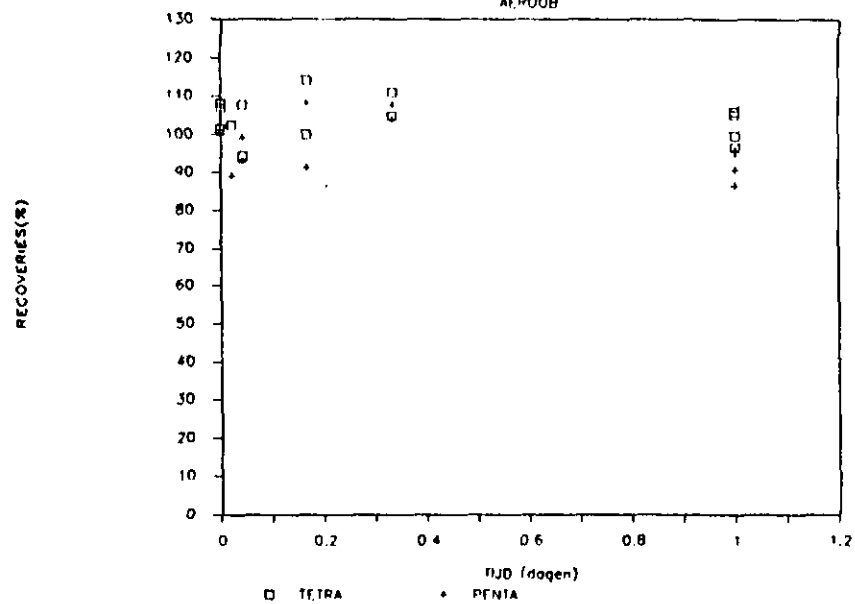
BIODEGRADATIE EXPERIMENT

AEROOB



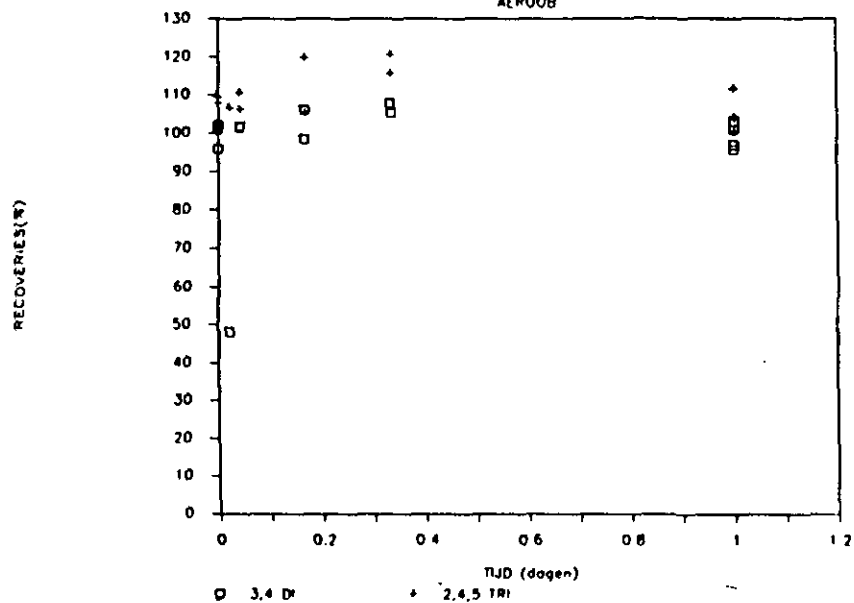
BIODEGRADATIE EXPERIMENT

AEROOB

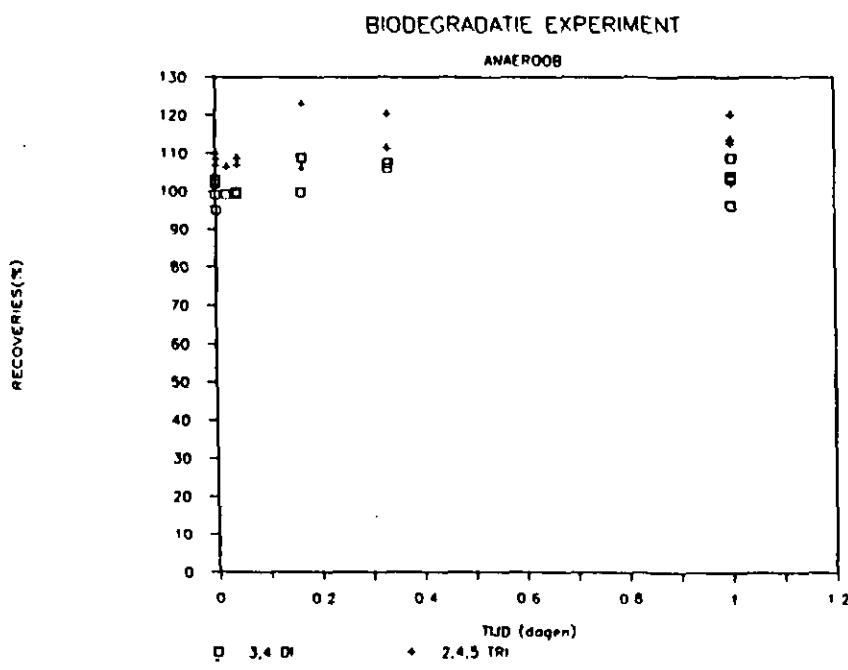
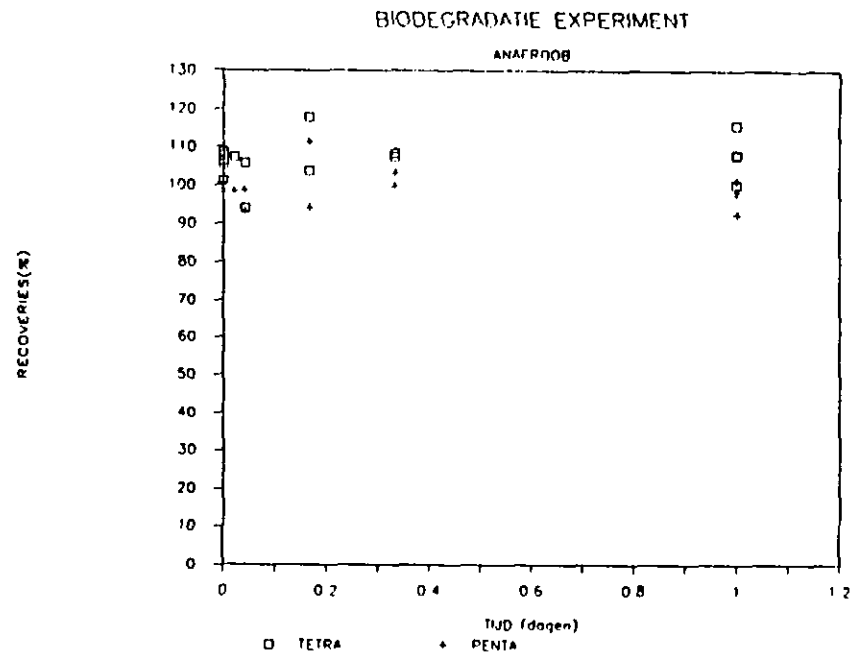
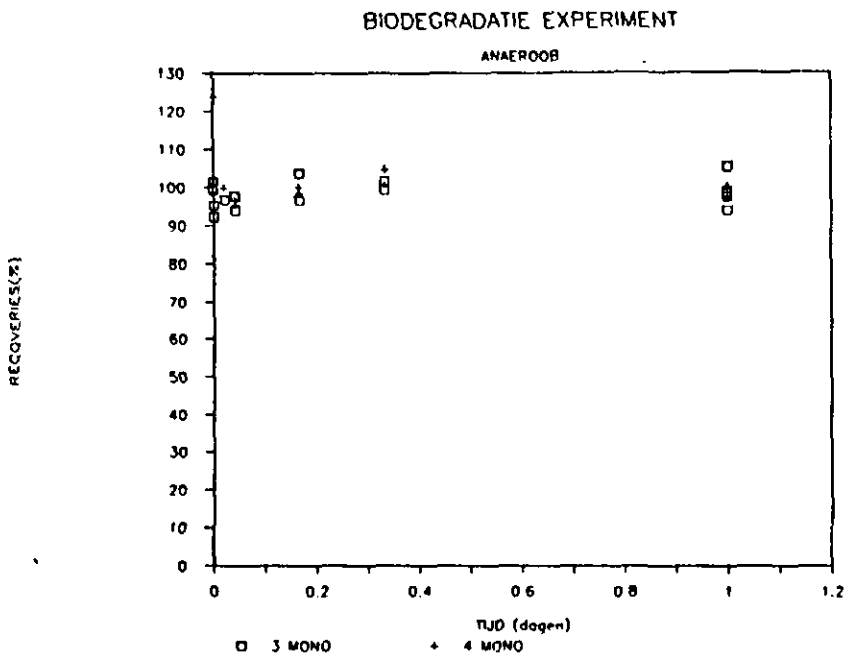


BIODEGRADATIE EXPERIMENT

AEROOB

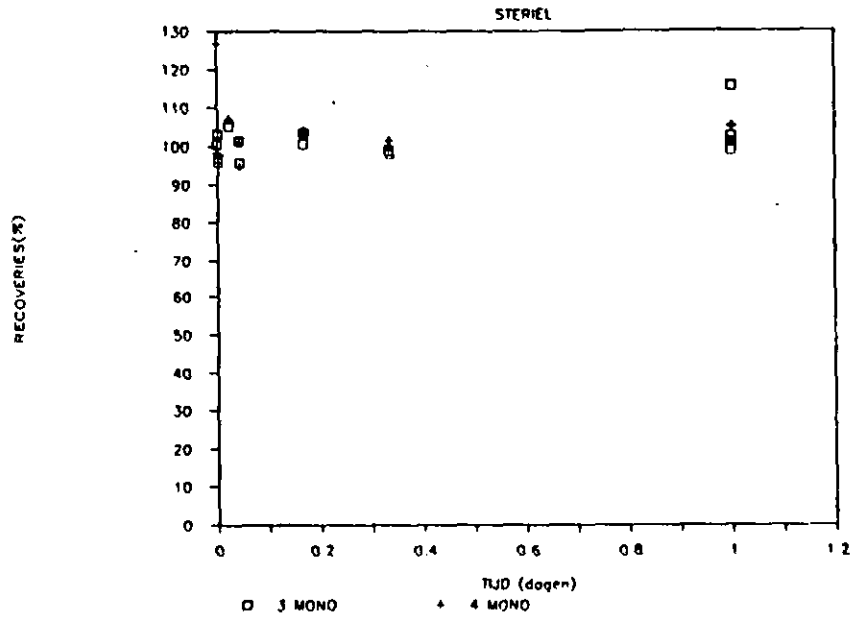


FIGUUR 5.5: Verloop van de concentraties van chloorfenolen tijdens de eerste dag van aerobisch geïncubeerde monsters met Rolde grond.

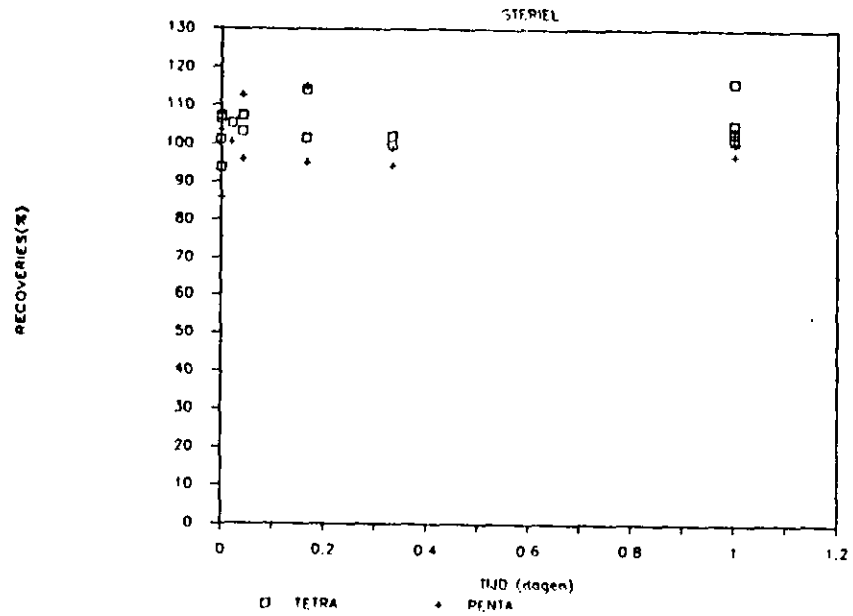


FIGUUR 5.6: Verloop van de concentraties van chloorfenolen tijdens de eerste dag van anaeroob geïncubeerde monsters met Rolde grond.

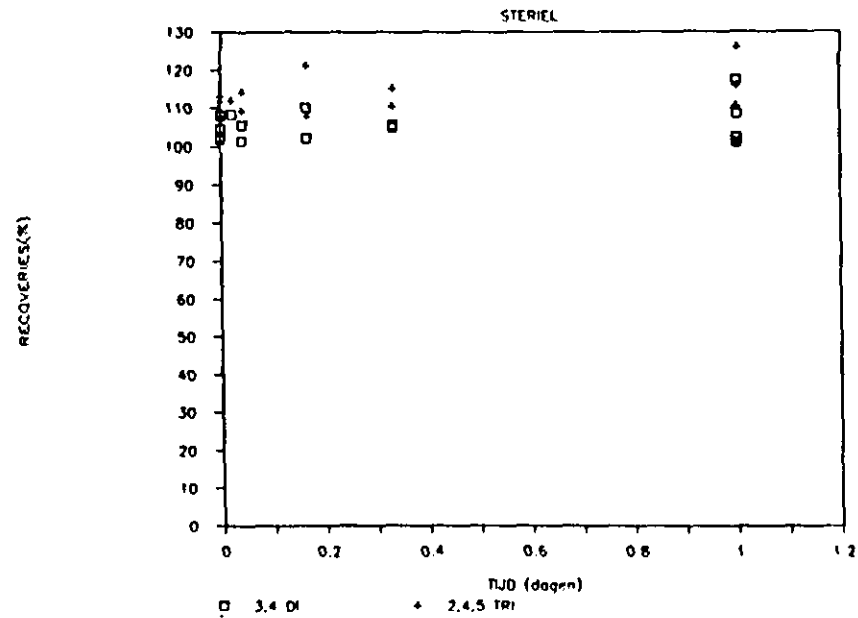
BIODEGRADATIE EXPERIMENT



BIODEGRADATIE EXPERIMENT

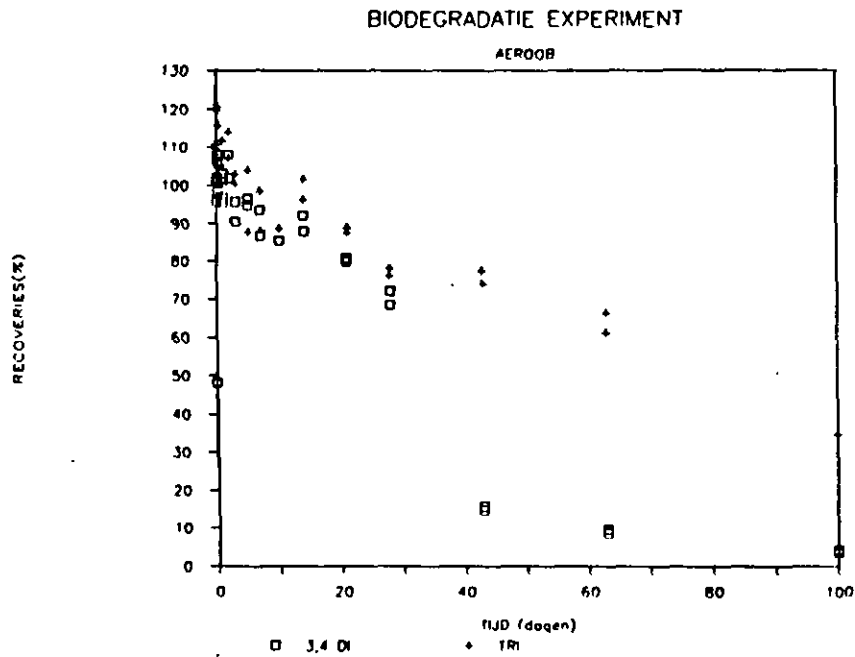
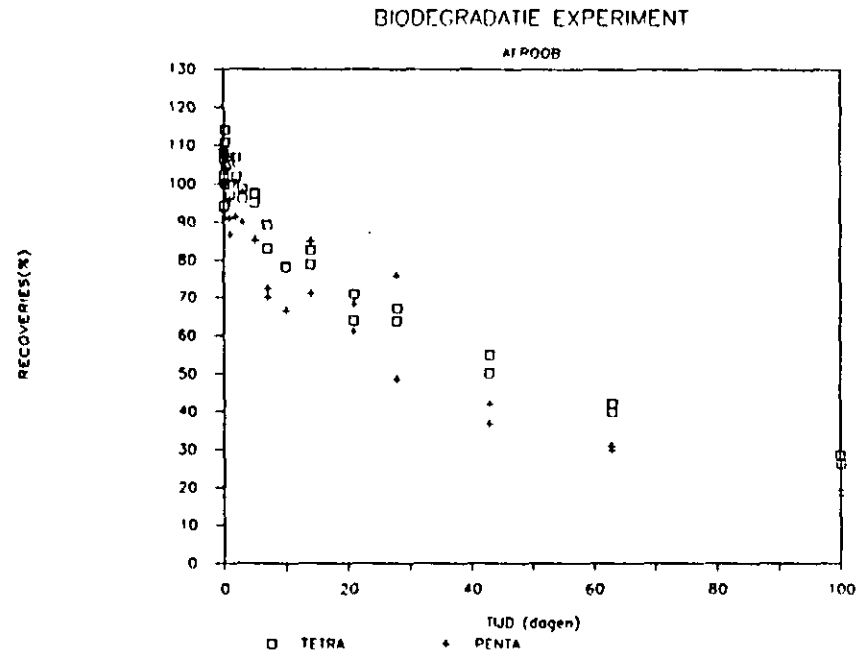
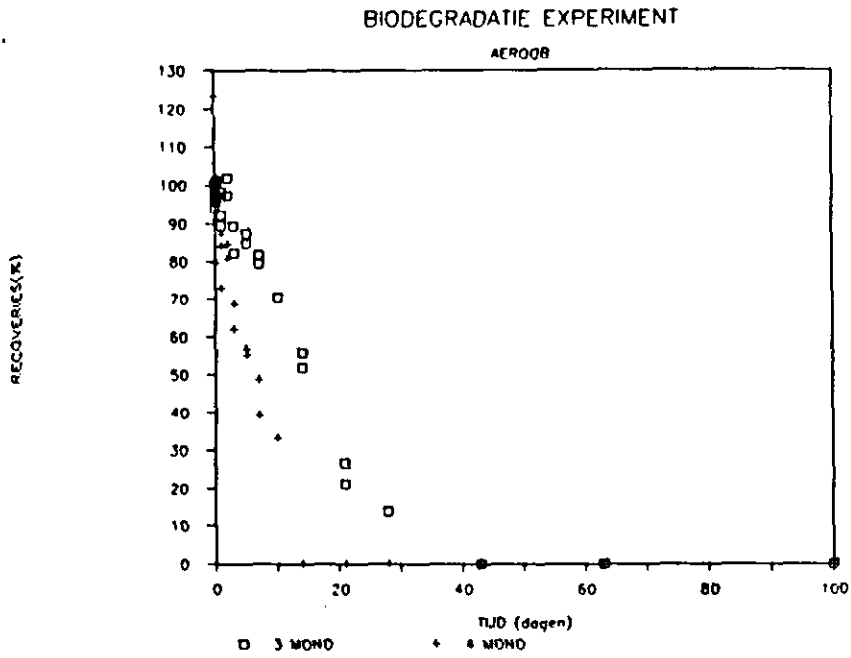


BIODEGRADATIE EXPERIMENT

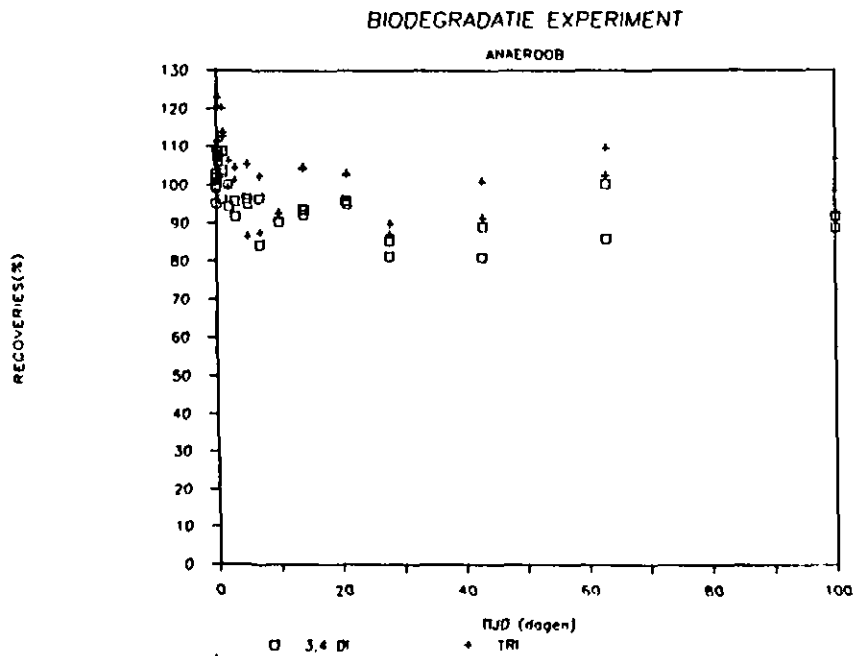
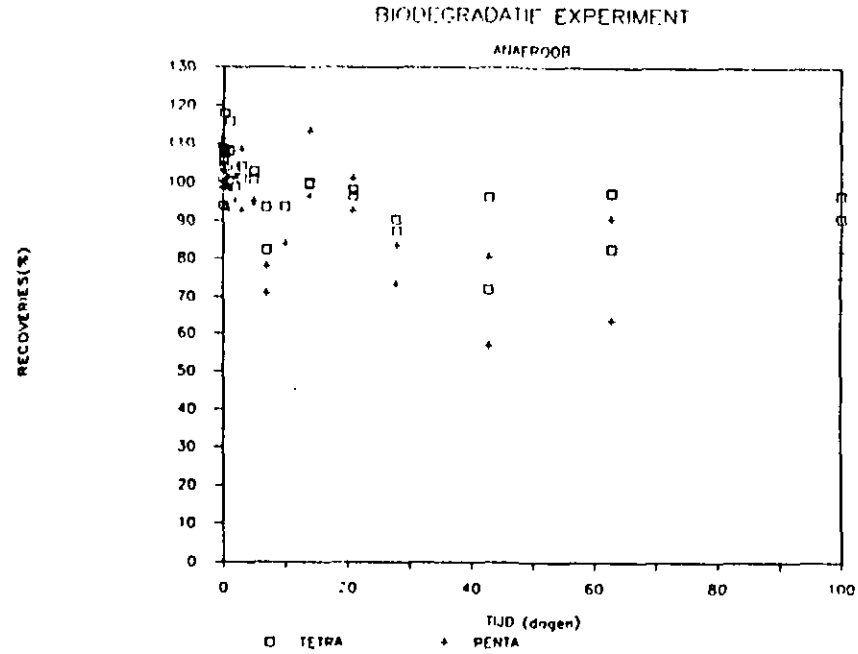
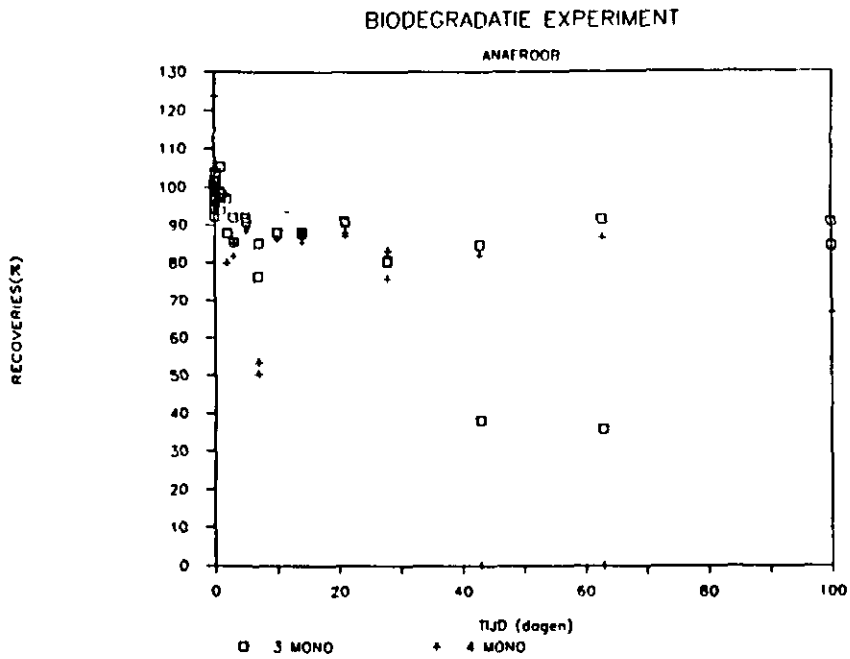


FIGUUR 5.7: Verloop van de concentraties van chloorfenolen tijdens de eerste dag van steriel geïncubeerde wonsters met Rolde grond.



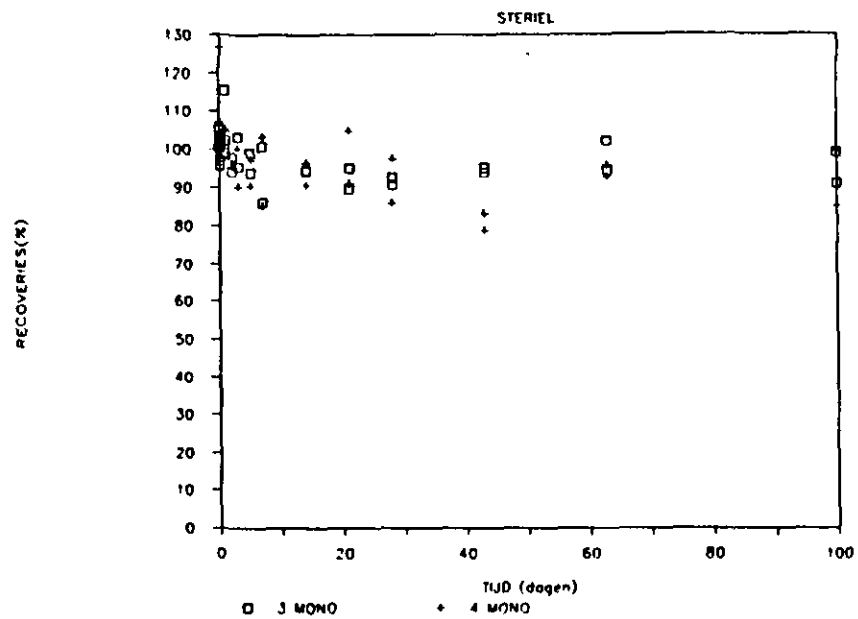


FIGUUR 5.8: Verloop van de concentraties van chloorfenolen in Rolde grond in de tijd onder aerobe omstandigheden.

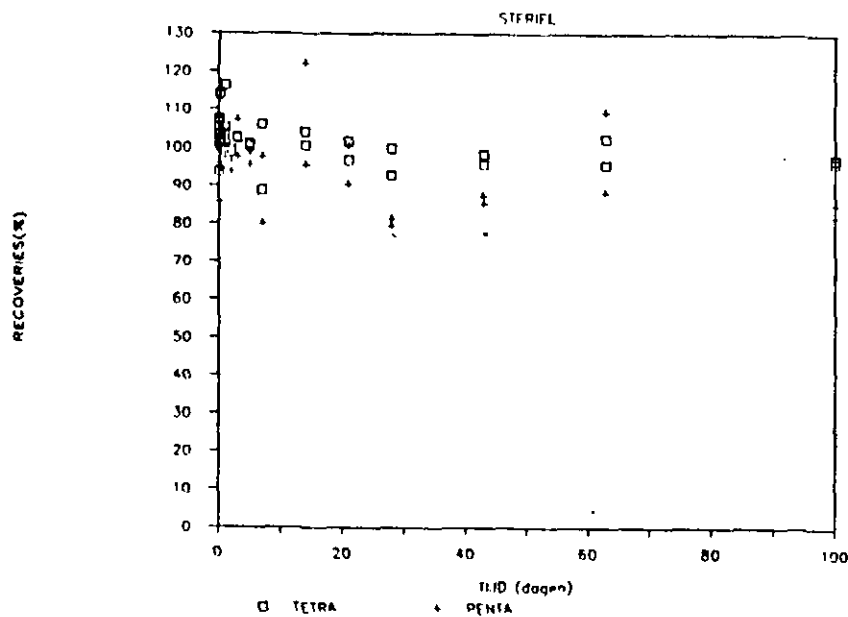


FIGUUR 5.9: Verloop van de concentraties van chloorfenolen in Rolde grond in de tijd onder anaerobe omstandigheden.

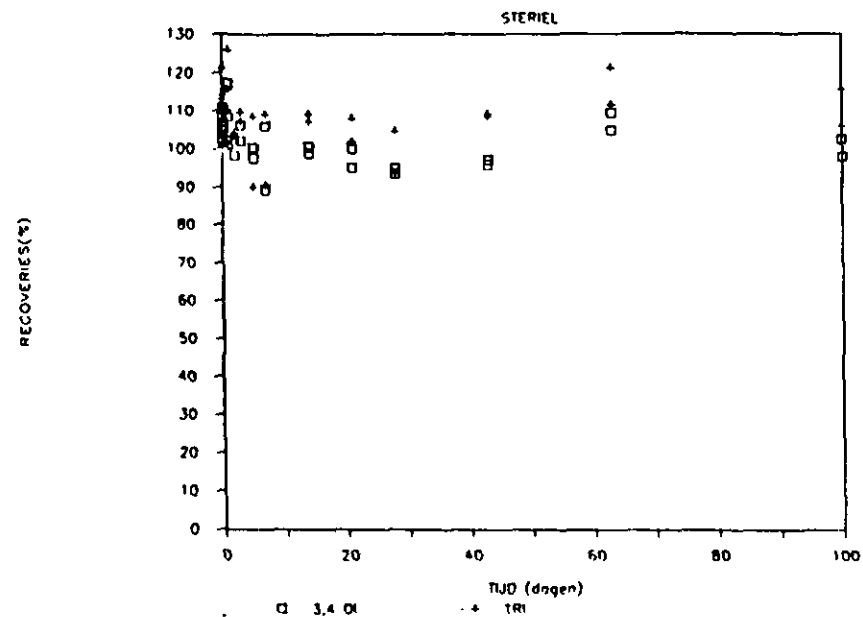
BIODEGRADATIE EXPERIMENT



BIODEGRADATIE EXPERIMENT



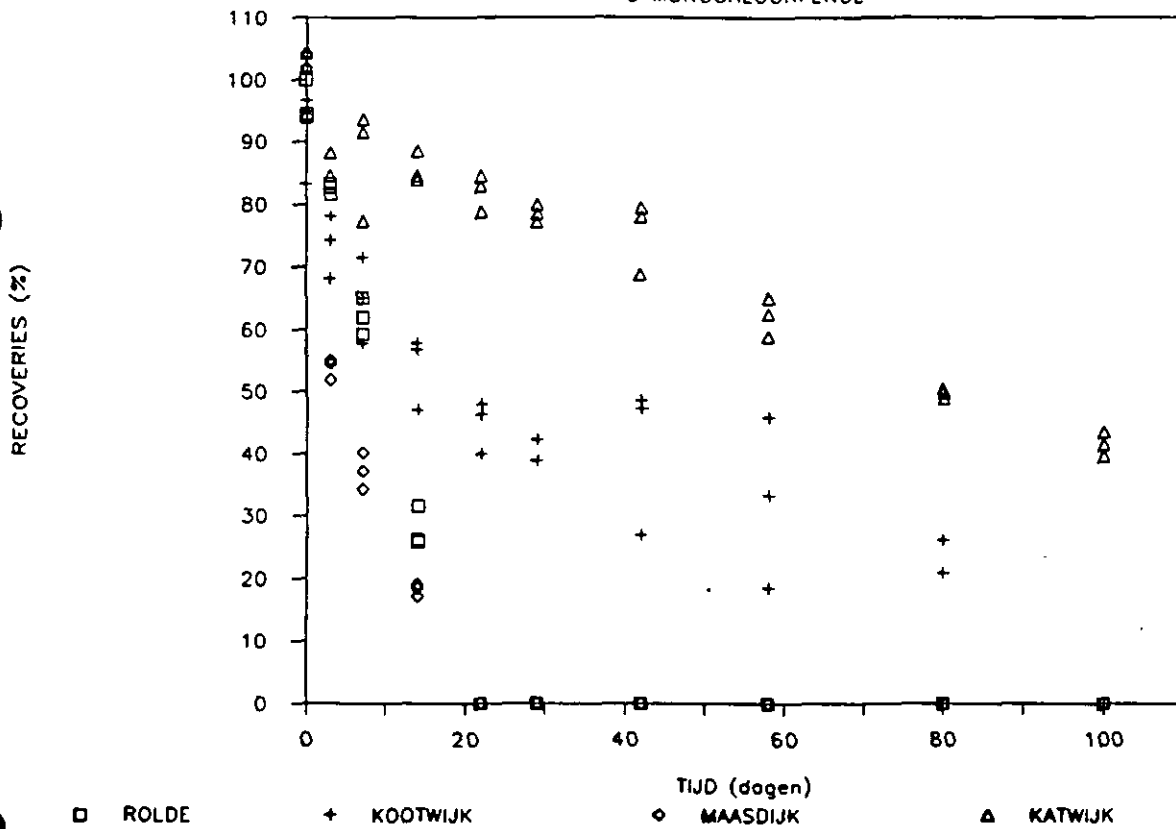
BIODEGRADATIE EXPERIMENT



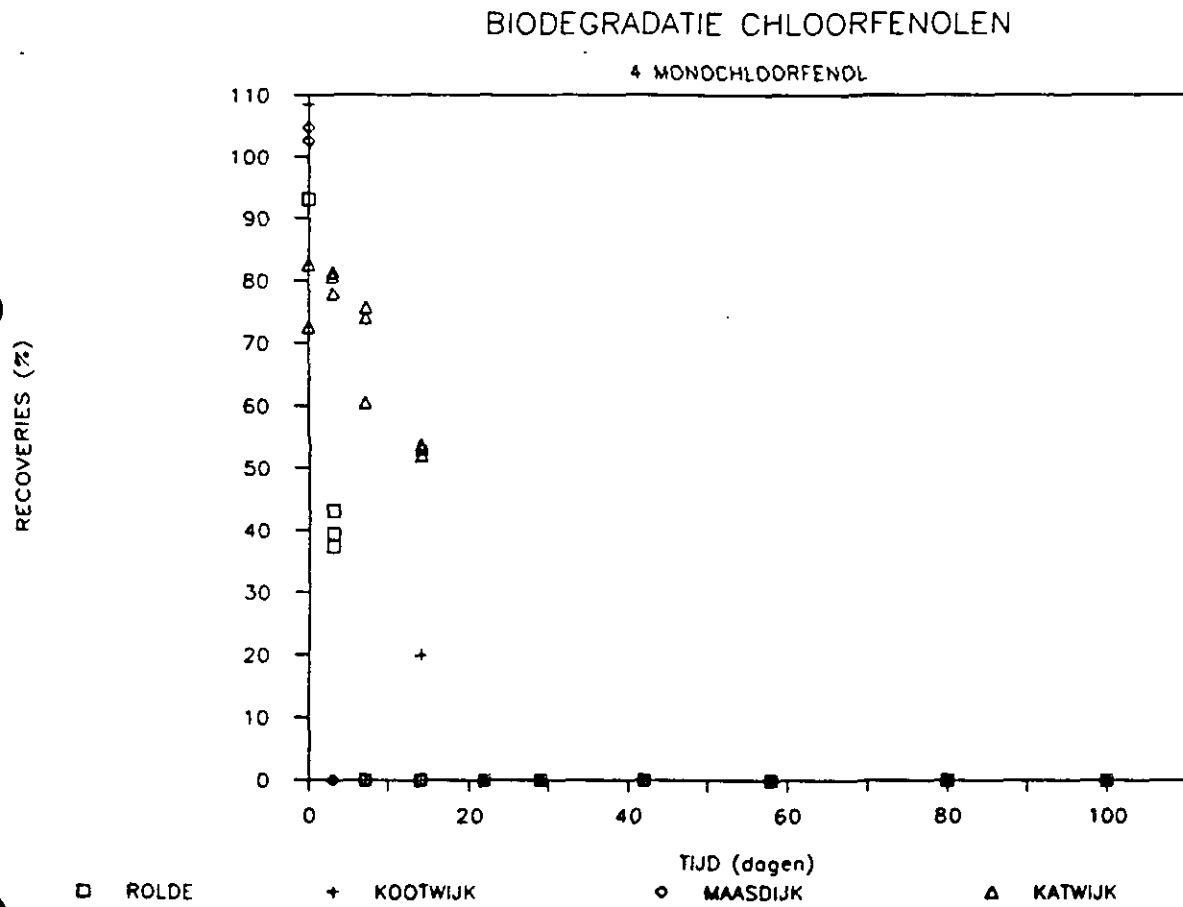
FIGUUR 5.10: Verloop van de concentraties van chloorfenolen in Rolde grond in de tijd onder steriele omstandigheden.

### BIODEGRADATIE CHLOORFENOLEN

3 MONOCHLOORFENOL



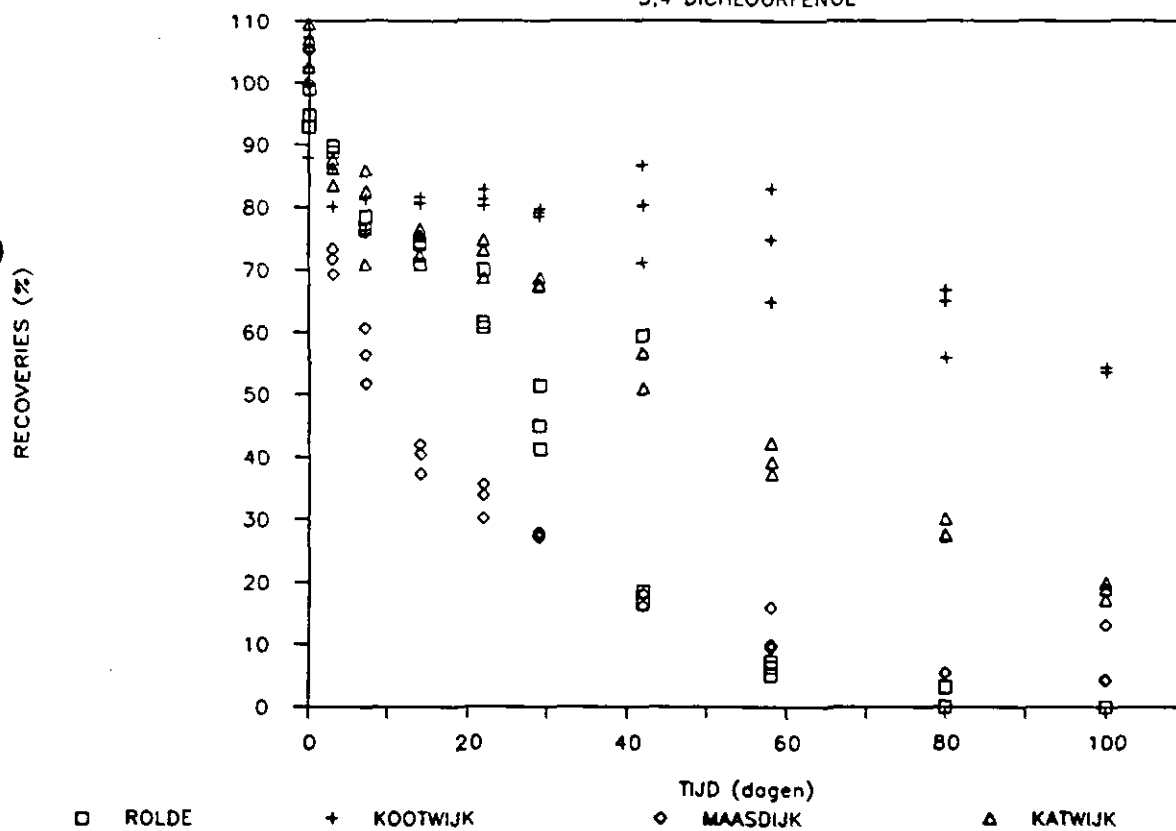
FIGUUR 5.11: Verloop van de concentratie 3-monochloorfenol, uitgedrukt als recovery, in de tijd onder aerobe omstandigheden in vier verschillende grondsoorten.



FIGUUR 5.12: Verloop van de concentratie 4-monochloorfenol, uitgedrukt als recovery, in de tijd onder aerobe omstandigheden in vier verschillende grondsoorten.

### BIODEGRADATIE CHLOORFENOLEN

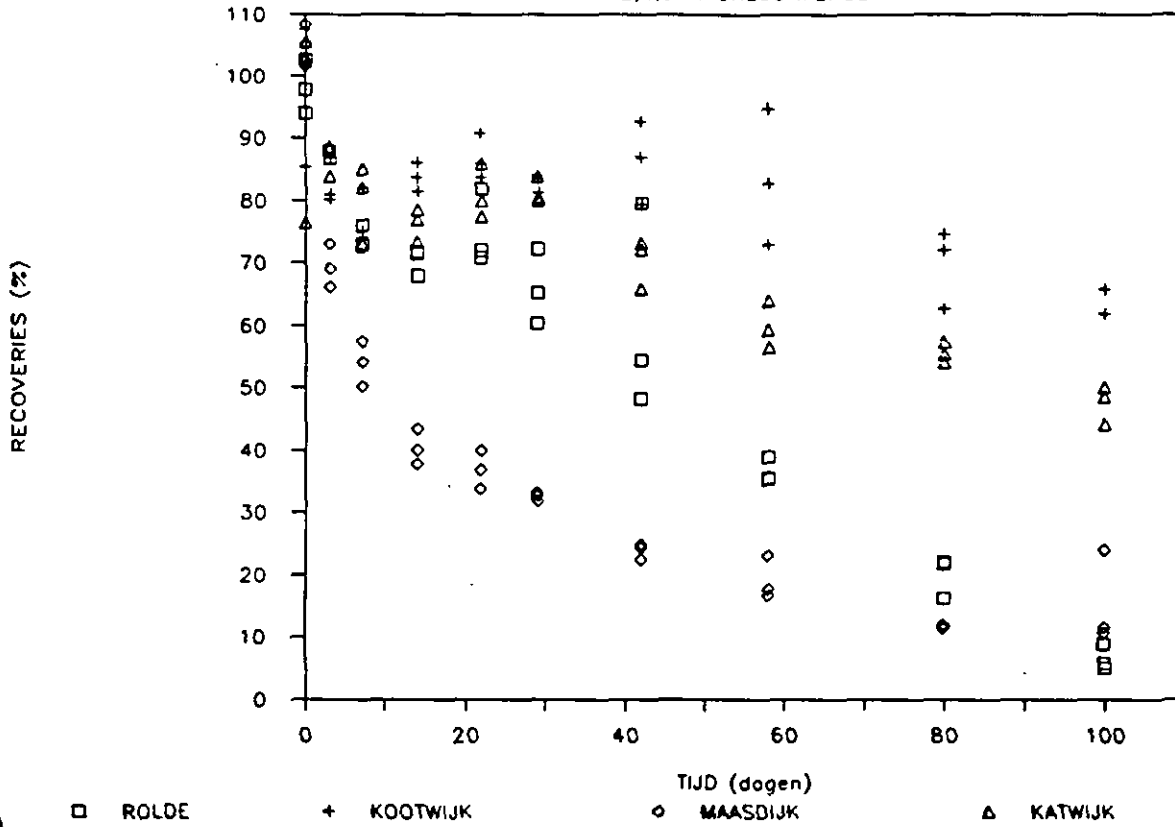
3,4 DICHLORFENOL



FIGUUR 5.13: Verloop van de concentratie 3,4-dichloorfenol, uitgedrukt als recovery, in de tijd onder aerobe omstandigheden in vier verschillende grondsoorten.

### BIODEGRADATIE CHLOORFENOLEN

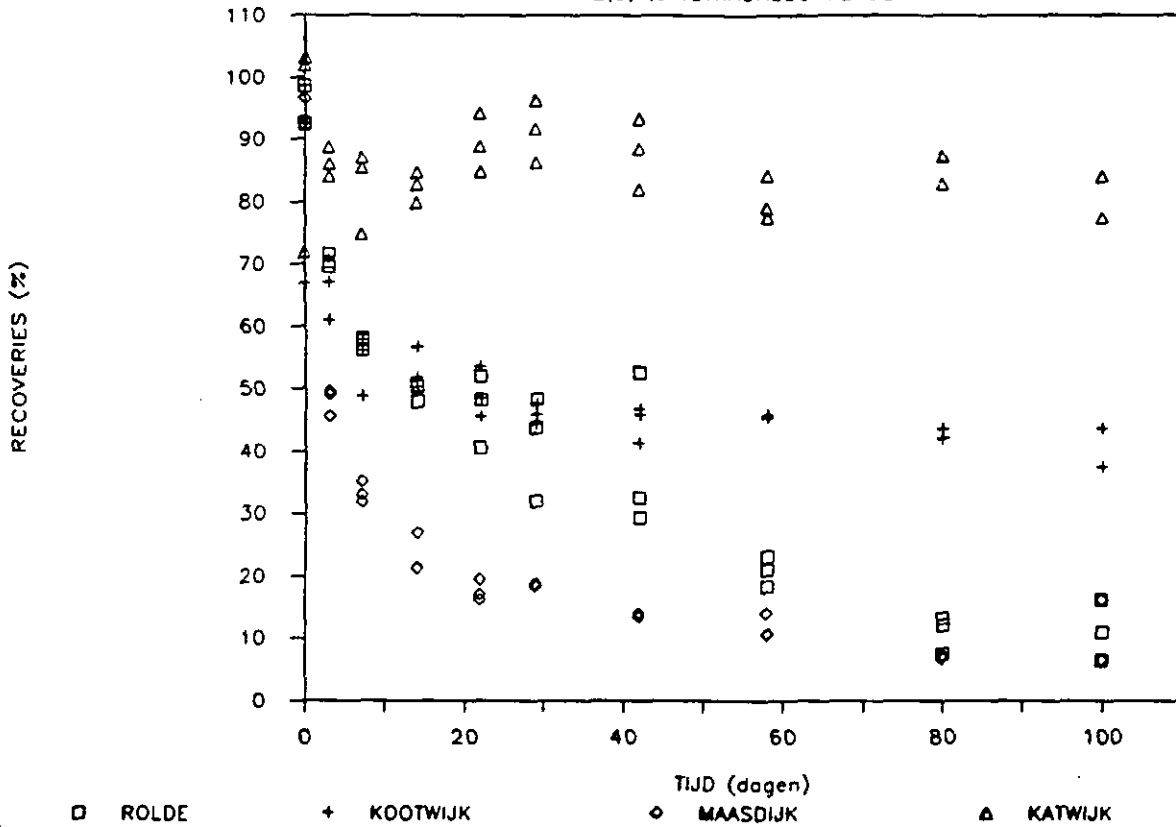
2,4,5 TRICHOORFENOL



FIGUUR 5.14: Verloop van de concentratie 2,4,5-trichloorfenol, uitgedrukt als recovery, in de tijd onder aerobe omstandigheden in vier verschillende grondsoorten.

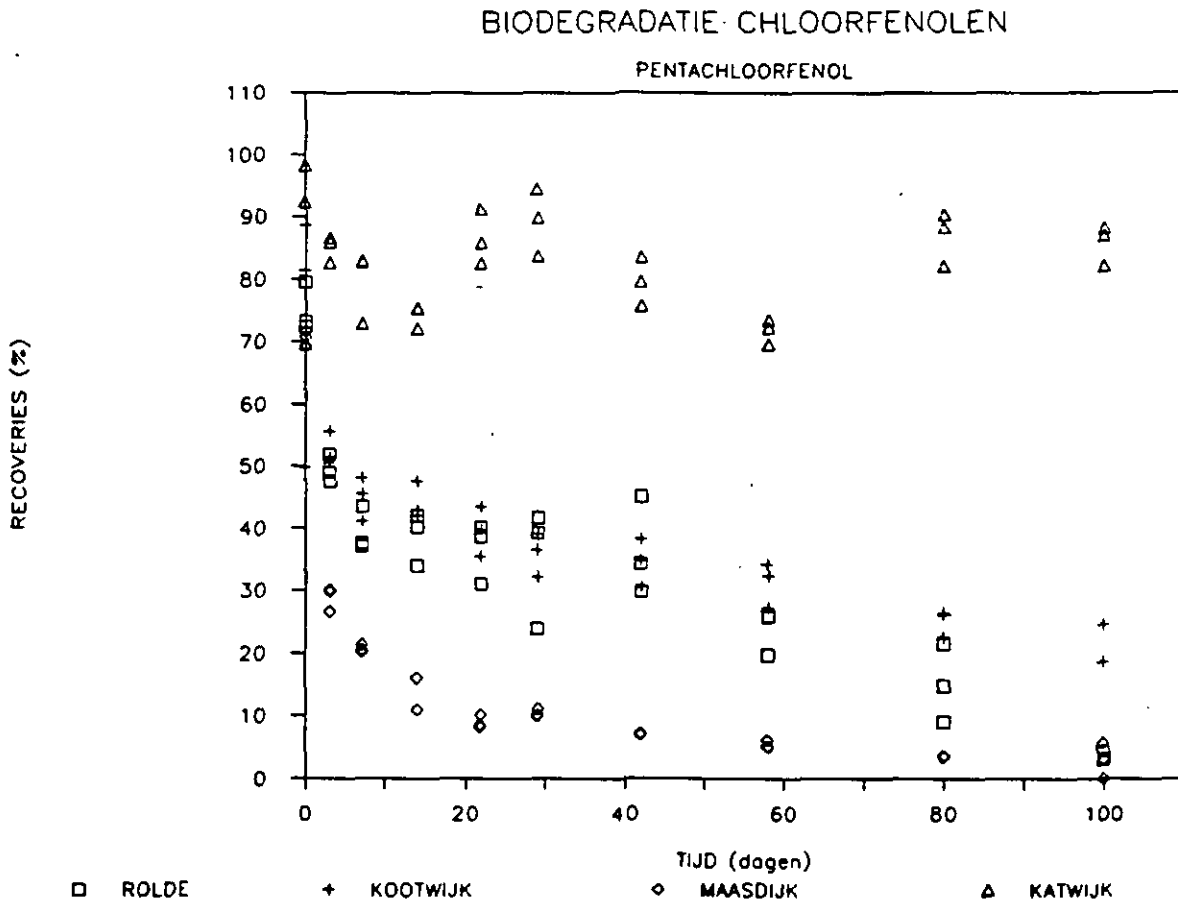
### BIODEGRADATIE CHLOORFENOLEN

2,3,4,6 TETRACHLOORFENOL

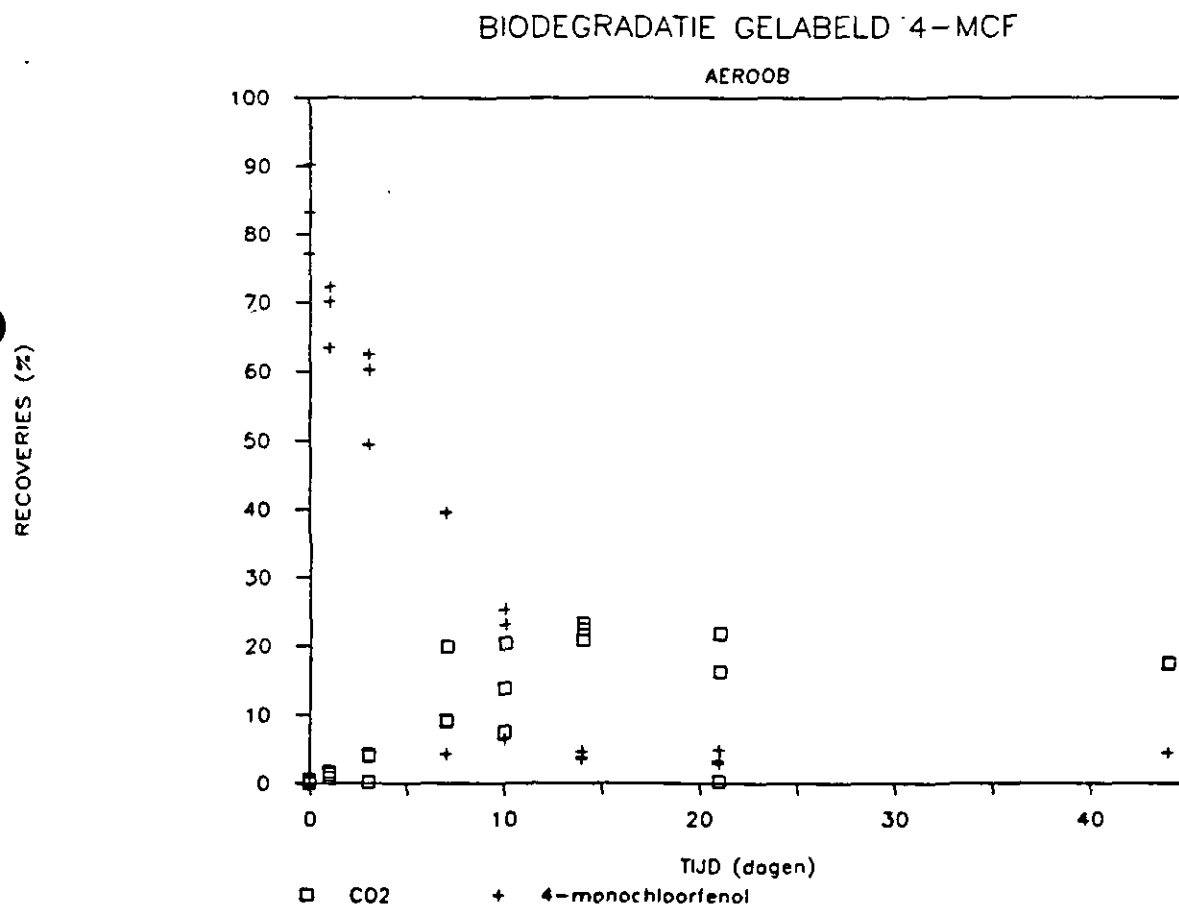


FIGUUR 5.15: Verloop van de concentratie 2,3,4,6-tetrachloorfenol, uitgedrukt als recovery, in de tijd onder aerobe omstandigheden in vier verschillende grondsoorten.

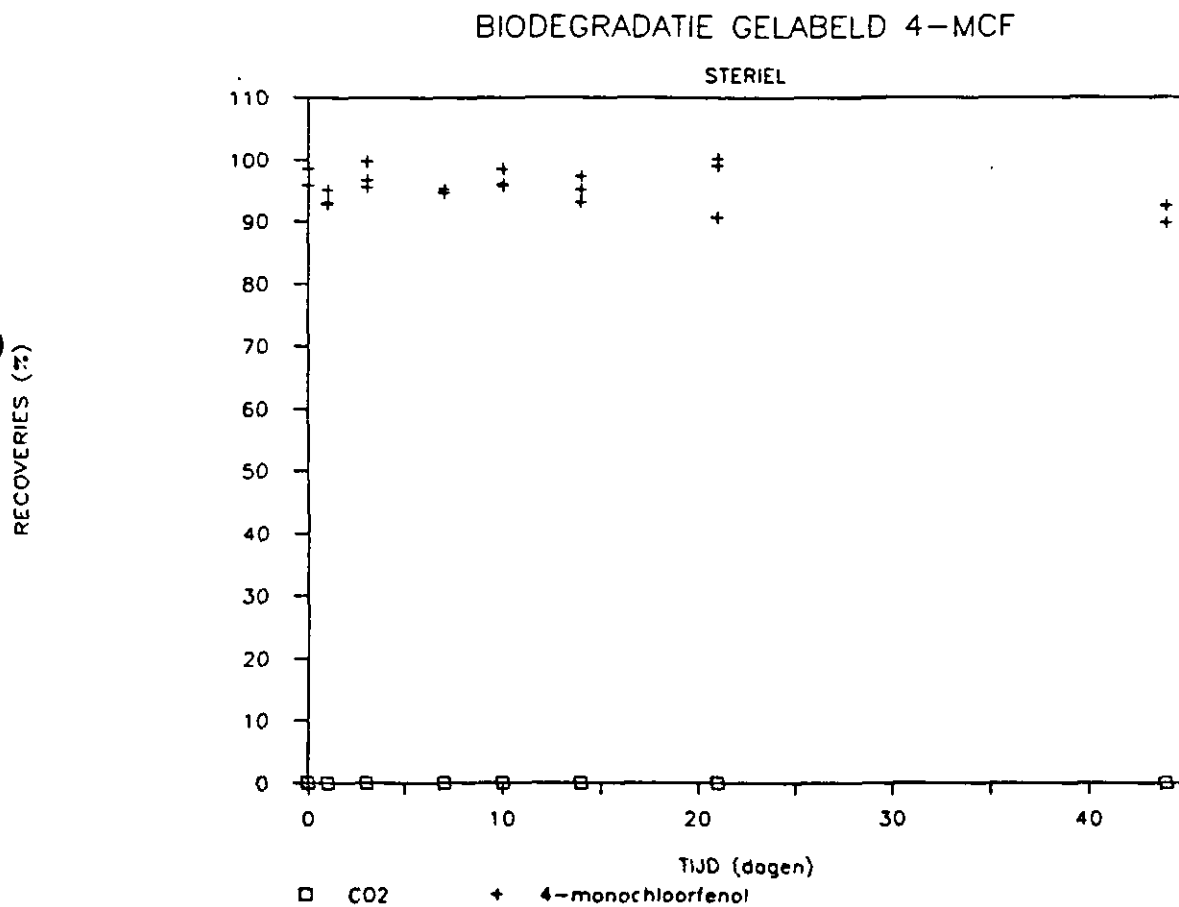




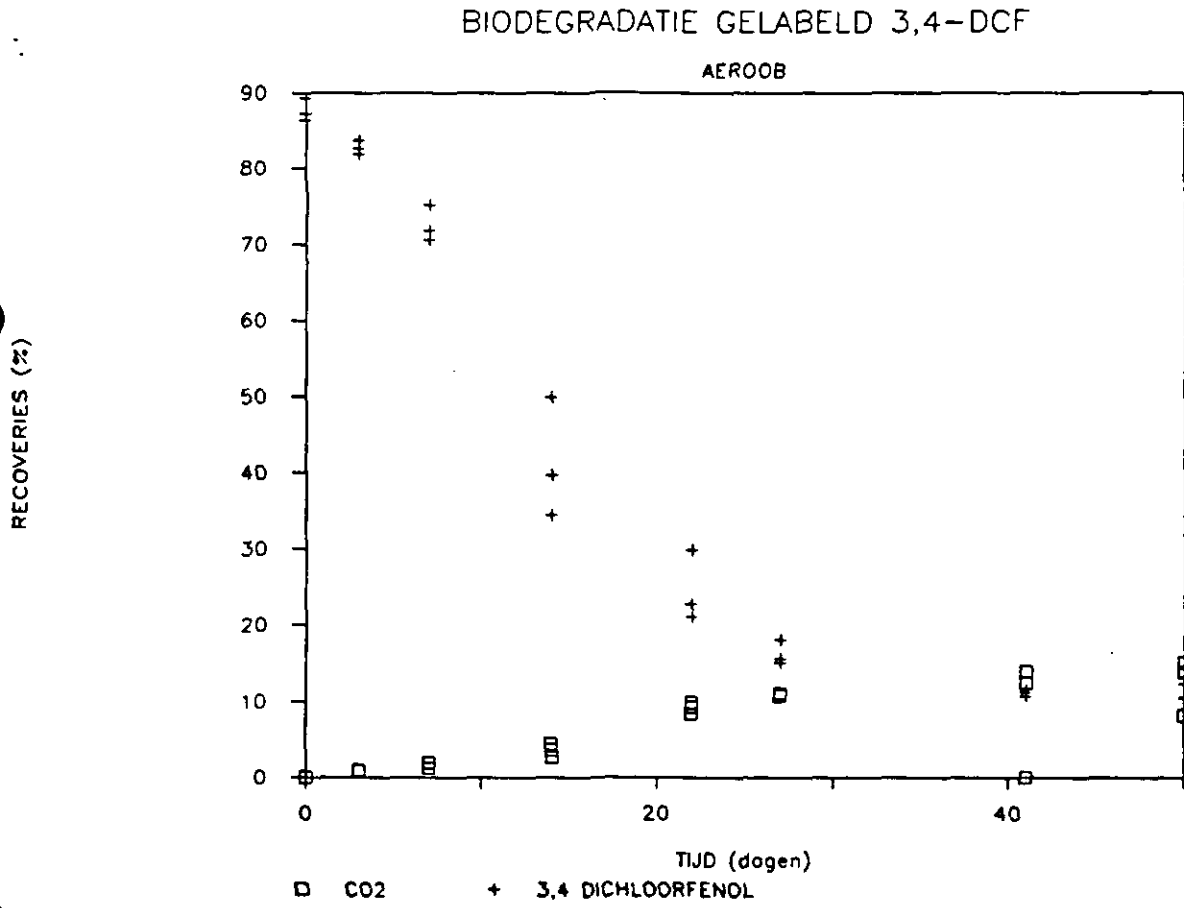
FIGUUR 5.16: Verloop van de concentratie pentachloorfenol, uitgedrukt als recovery, in de tijd onder aerobe omstandigheden in vier verschillende grondsoorten.



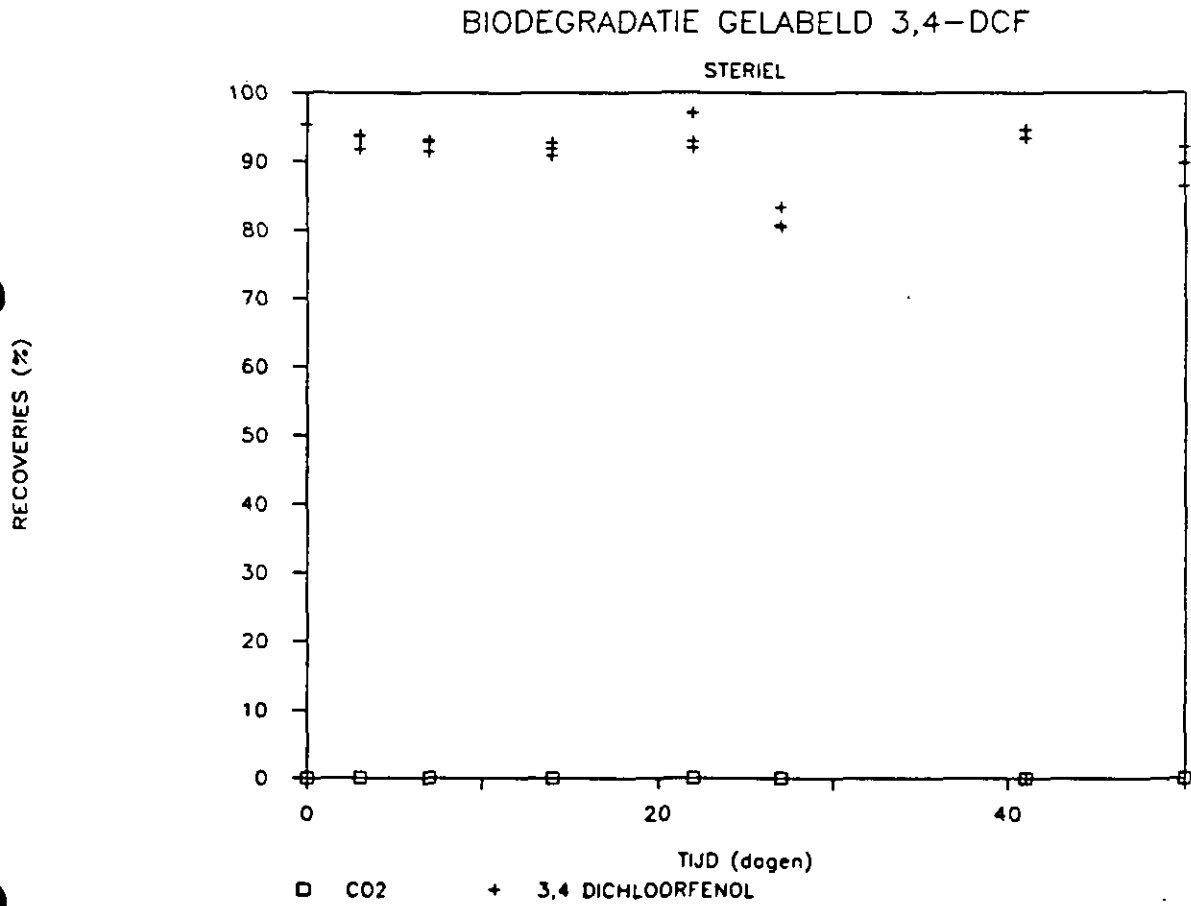
FIGUUR 5.17: Verloop van de concentratie van gelabeld 4-monochloorfenol en de vorming van CO<sub>2</sub>, uitgedrukt als recoveries, in Rolde grond in de tijd onder aerobe omstandigheden.



FIGUUR 5.18: Verloop van de concentratie van gelabeld 4-monochloorfenol en de vorming van CO<sub>2</sub>, uitgedrukt als recoveries, in Rolde grond in de tijd onder steriele omstandigheden.



FIGUUR 5.19: Verloop van de concentratie van gelabeld 3,4-dichloorfenol en de vorming van CO<sub>2</sub>, uitgedrukt als recoveries, in Rolde grond in de tijd onder aerobe omstandigheden.



FIGUUR 5.20: Verloop van de concentratie van gelabeld 3,4-dichloorfenol en de vorming van CO<sub>2</sub>, uitgedrukt als recoveries, in Rolde grond in de tijd onder steriele omstandigheden.

## HOOFDSTUK 6: DISCUSSIE.

### 6.1: ANALYTISCH ONDERZOEK.

De aanpassingen van de extractieprocedure (pH-verhoging en verandering toegevoegde hoeveelheden azijnzuuranhydride en boraxoplossing) hebben geleid tot betere recoveries tijdens de experimenten. Door de verhoging van de pH worden alle chloorfenolen in de gedissocieerde toestand gebracht waardoor ze beter oplossen in de waterfase en/of beter reageren met azijnzuuranhydride. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het verbeterde extractierendement.

### 6.2: BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN (ONGELABELD).

#### 6.2.1: Rolde kort.

Uit de resultaten blijkt dat onder geen enkele conditie een afname van de concentratie chloorfenolen plaatsvindt binnen een tijdsduur van 24 uur. Dit betekent dat er geen biodegradatie en ook geen gebonden residu vorming plaatsvindt. Dit laatste is in tegenspraak met de resultaten van Deul (1987), die wel binnen dit tijdsbestek vorming van gebonden residu vond. Waarschijnlijk wordt het verschil veroorzaakt door de wijziging in de extractieprocedure. Door de hogere pH tijdens de extractie kunnen blijkbaar meer chloorfenolen van de grond geëxtraheerd worden dan volgens de procedure van Deul.

#### 6.2.2: Rolde lang.

Voor de aerobe monsters blijkt een duidelijke afname van de concentratie chloorfenolen plaats te vinden, terwijl voor de steriele monsters geen afname wordt waargenomen. Dit betekent dat geen gebonden residuvorming plaatsvindt maar wel biodegradatie. Het is echter met deze methode niet mogelijk om vast te stellen of de biodegradatie mineralisatie betreft. De biodegradatiesnelheid is voor de verschillende chloorfenolen

duidelijk verschillend. De volgorde van toenemende persistentie is als volgt: 4-MCF < 3-MCF < DCF < PCF < TeCF < TCF.

Bij bovenstaande constatering is aangenomen dat er geen lager gechlloreerde verbindingen ontstaan uit de hoger gechlloreerde. Zou dit wel gebeurd zijn dan is de invloed waarschijnlijk gering aangezien de gebruikte concentraties voor de hoger gechlloreerde chloorfenolen veel lager zijn dan voor de lager gechlloreerde. Verder dient opgemerkt te worden dat in deze studie alleen het verdwijnen van de stof is bepaald en niet is gekeken naar de verdere afbraak van de chloorfenolen. De gegeven persistenties zijn alleen gebaseerd op de eerste afbraakstap. Uit bovenstaande reeks blijkt dat niet alleen het aantal chlooratomen van belang is maar ook de plaats van deze atomen. Uit het verschil tussen 3- en 4-monochloorfenol blijkt dat de para plaats voor monochloorfenol gunstiger is voor afbraak dan de meta plaats. Waarom trichloorfenol persistenter is dan tetra- en pentachloorfenol is niet duidelijk. Vonk et al (1981) vonden juist dat 2,4,5-TCF beter afbreekbaar was dan PCF onder aerobe omstandigheden in twee verschillende grondsoorten.

Uit de resultaten van de anaerobe monsters blijkt dat een geringe hoeveelheid zuurstof reeds voldoende is om biodegradatie van chloorfenolen mogelijk te maken. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Valo et al (1985) die vond dat bij 0,02 % zuurstof nog biodegradatie plaatsvond en dat eerst bij 0,002 % de biodegradatie stopte. Het is dus belangrijk er voor te zorgen dat de monsters volledig anaeroob zijn. Dat ook voor de anaerobe monsters geen afname van de chloorfenolenconcentraties plaatsvindt is nog een aanwijzing voor het ontbreken van gebonden residuen.

In de literatuur (Kaufman, 1978; Murthy, 1979 en Weiss, 1982) wordt wel afbraak onder anaerobe omstandigheden gevonden. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat men bij anaerobe incubatie moet uitgaan van anaeroob materiaal (anaerobe grond) en bij aerobe incubatie van aerob materiaal. Bij de uitgevoerde experimenten is uitgegaan van aerob materiaal en dit is anaeroob geïncubeerd. Mogelijk is de adaptatietijd

voor de microorganismen te lang om afbraak van chloorfenolen te vinden. Uitgaande van anaeroob materiaal zou wel afbraak van chloorfenolen kunnen plaatsvinden. Een andere mogelijke verklaring is dat de redoxpotentiaal niet laag genoeg was. Dit is niet gecontroleerd tijdens de experimenten.

### 6.2.3: Totaal experiment.

Voor de verschillende gronden kan men reeksen samenstellen met toenemende persistentie van de verschillende chloorfenolen. Deze zien er als volgt uit:

Maasdijk 4-MCF < 3-MCF < PCF < DCF < TeCF < TCF

Rolde 4-MCF < 3-MCF < DCF < PCF < TeCF < TCF

Kootwijk 4-MCF < 3-MCF < PCF < TeCF < DCF < TCF

Katwijk 4-MCF < DCF < 3-MCF < TCF < TeCF < PCF

De reeks van Katwijk wijkt duidelijk af van de andere drie gronden. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door het lage organische stofgehalte en/of de hoge pH van Katwijk grond. De andere drie gronden (Maasdijk, Rolde en Kootwijk) hebben reeksen met slechts kleine verschillen in de volgorde van persistentie van chloorfenolen. Opvallend is dat bij deze gronden trichloorfenol persistenter is dan tetra- en pentachloorfenol. Het is uit de literatuur bekend dat dehydrodehalogenatie voor PCF en TeCF gemakkelijker verloopt dan voor TCF. Als we dus aannemen dat de hoger gechlloreerde chloorfenolen worden afgebroken met als eerste stap dehydrodechlorering zou dit een verklaring kunnen zijn waarom TCF meer persistent is dan TeCF en PCF. In Katwijk grond wordt TCF wel sneller afgebroken dan PCF. Dit werd ook gevonden door Vonk et al (1981) in een zandgrond en een zandige leemgrond (gehalte org. C resp. 2.2 en 1.1 %). Mogelijk spelen sorptieprocessen een belangrijke rol bij de afbraak van chloorfenolen. De beide monochloorfenolen worden het snelst afgebroken, hetgeen zou kunnen betekenen dat deze afbraak volgens een ander mechanisme verloopt dan de hoger gechlloreerde chloorfenolen. Mogelijk kan bij monochloorfenol meteen ringopening plaatsvinden.



De volgorde van de grondsoorten met toenemende persistentie voor de chloorfenolen is: Maasdijk < Rolde < Kootwijk < Katwijk. Deze volgorde komt overeen met de volgorde van aantallen chloorfenolafbrekers in deze gronden (Tabel 5.1).

De berekende halfwaardetijden kunnen een vertekend beeld geven, omdat het model uitgaat van eerste orde afbraak. De resultaten tonen aan dat dit niet in alle gevallen zo is. De aanduiding van lagfasen voor drie chloorfenolen in Rolde grond lijkt ook niet juist, daar in deze tijd een duidelijke afname in de concentratie waarneembaar is. De afbraak volgt geen eerste orde kinetiek zodat het model eigenlijk niet toegepast mag worden. De berekende halfwaardetijden kunnen het beste gezien worden als een aanduiding voor de snelheid van afbraak.

Dat bij de anaerobe experimenten bij Kootwijk met 4-monochloorfenol geïncubeerd een halfwaardetijd van 73 dagen wordt gevonden komt doordat in dit experiment relatief veel monsters waren waarin zuurstof aanwezig was. Deze monsters zijn in de berekening van de halfwaardetijd van de anaerobe experimenten meegenomen.

Dit experiment toont nogmaals aan dat zeer weinig zuurstof voldoende is voor afbraak van chloorfenolen en dat onder strikt anaerobe condities geen afbraak wordt waargenomen binnen deze incubatieperiode, ongeacht de grondsoort.

In geen van de gronden is vorming van gebonden residuen of chemische omzetting waargenomen (geen afname van de chloorfenolconcentraties voor steriele en anaerobe monsters).

Het is bij de hier gebruikte extractiemethode mogelijk dat gebonden residu wordt meegeëxtraheerd t.g.v. de hoge pH. Men mag volgens de IUPAC-definitie bij de bepaling van gebonden residu alleen extraheren met organische oplosmiddelen en niet met sterke zuren en basen. Bij deze extractiemethode zijn in het geheel geen organische oplosmiddelen gebruikt maar is geëxtraheerd bij pH 12. Bij deze pH kan mogelijk een

gedeelte van de organische stof oplossen en dit kan tot gevolg hebben dat hieraan gebonden chloorfenolen weer in oplossing komen. Dit kan een verklaring zijn waarom Deul (1987) wel gebonden residu vond en in dit onderzoek geen gebonden residu meer wordt gevonden.

Gebonden residu vorming is dus afhankelijk van de gebruikte extractiemethode en men moet erg voorzichtig zijn met conclusies omtrent al dan niet optreden van gebonden residuvorming.

### 6.3: ERVARINGSEXPERIMENTEN GELABELD.

De procedures voor de extractie van chloorfenolen en voor meting van  $^{14}\text{C}$   $\text{CO}_2$  productie blijken gebruikt te kunnen worden voor de uitgevoerde experimenten. Voor de  $^{14}\text{C}$   $\text{CO}_2$ -bepaling wordt gekozen om 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  toe te voegen aan de grond en om voor elk experiment beide flesjes met Carbosorb te tellen.

### 6.4: BIODEGRADATIE EXPERIMENTEN ( $^{14}\text{C}$ -GELABELD).

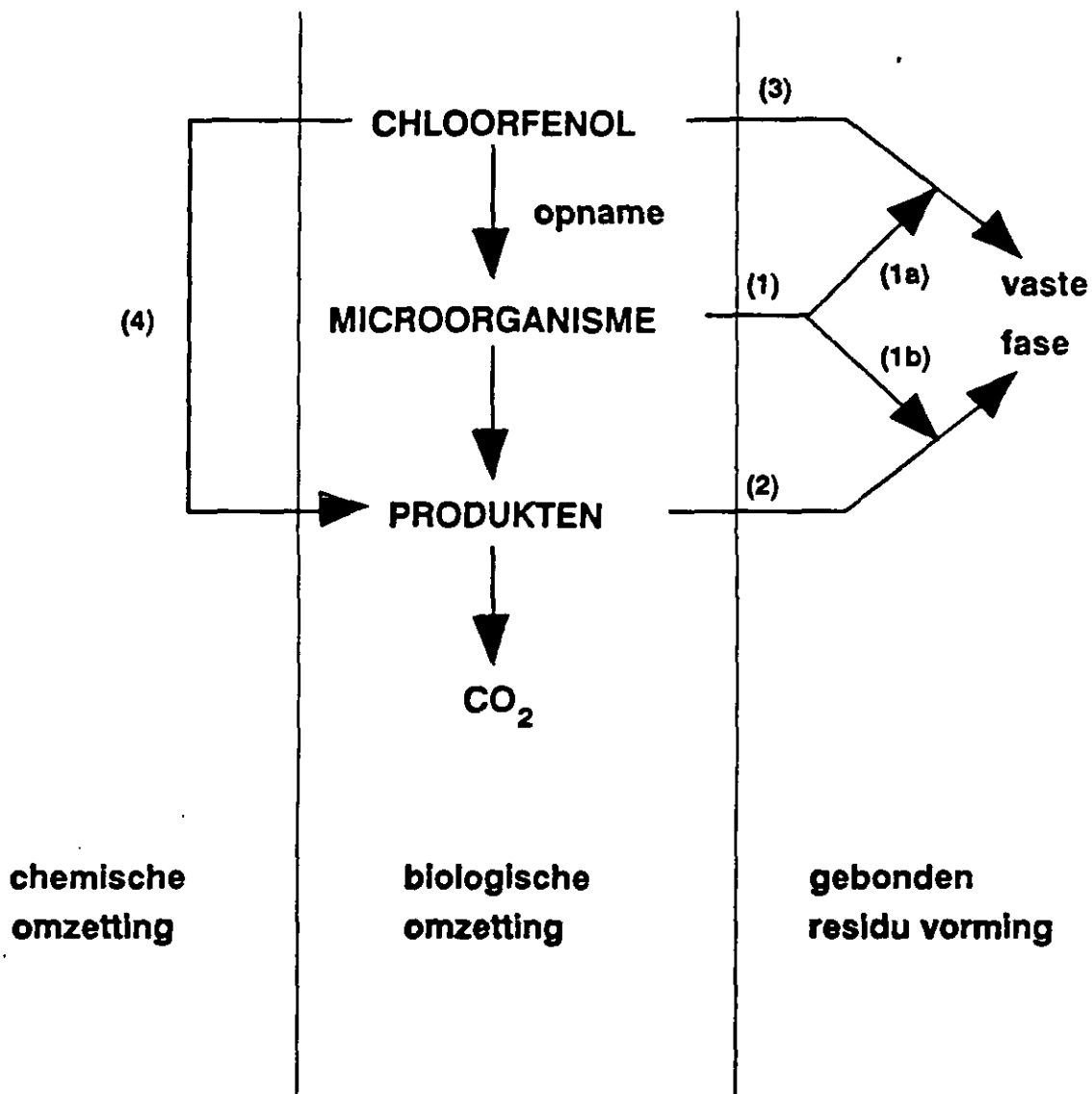
Er is nog geen verklaring waarom slechts 20 % van de verwijderde chloorfenolen als  $\text{CO}_2$  wordt teruggevonden, terwijl in de literatuur vaak veel hogere waarden gevonden zijn (bijv: Valo et al, 1985; 60-80 %  $\text{CO}_2$  uit PCF). Opmerkelijk is dat deze lage hoeveelheden  $\text{CO}_2$  in alle geteste grondsoorten werden gevonden. Dit duidt op de vorming van intermediairen. Het blijkt dat microbiologische activiteit nodig is voor de verwijdering van chloorfenolen uit grond, en dat deze biodegradatie geen complete mineralisatie betreft.

Uit de resultaten van de destructies blijkt dat meerdere processen een rol spelen bij de omzetting van chloorfenolen in de bodem. Er treedt mineralisatie, vorming van intermediairen en vorming van gebonden residu op. Het is echter nog niet duidelijk op welke wijze deze

processen in de bodem plaatsvinden en een kwantificering van de verschillende processen is nog niet mogelijk. Een voorbeeld is het verschil in activiteit tussen de boraxoplossingen voor en na toevoeging van azijnzuuranhydride en petroleumether namelijk resp. 30 % en 7 %. Het verschil kan niet verklaard worden door de activiteit in de petroleumetherfase (waarschijnlijk chloorfenolen), want die is slechts 12 %. Waar de rest van de activiteit zich bevindt is niet duidelijk, ook omdat de activiteit van de vaste fase niet lijkt toe te nemen. Mogelijk zit de activiteit in de grenslaag tussen petroleumether en boraxoplossing.

De processen die mogelijk een rol spelen bij het gedrag van chloorfenolen in de bodem zijn schematisch weergegeven in figuur 6.1. Door het uitgevoerde onderzoek is enige helderheid verkregen welke processen een rol spelen.

Uit het onderzoek met gesteriliseerde grond en niet steriele, anaeroob geïncubeerde grond kan geconcludeerd worden dat de routes (3) en (4), chemische omzetting en niet-biogekatalyseerde gebonden residuvorming niet optreden. Een mogelijkheid die nog open staat is dat door sterilisatie of anaerobe omstandigheden de bodemcondities dermate verstoord zijn dat deze processen dan niet kunnen optreden, maar onder aerobe omstandigheden wel optreden. Aangezien echter in de kortdurende experimenten onder aerobe, niet steriele omstandigheden ook geen aanwijzingen gevonden zijn dat de processen (3) en (4) optreden, lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat deze processen niet optreden. De biodegradatieroute met produkt- en CO<sub>2</sub>-vorming treedt in ieder geval op. De vraag die resteert betreft de gebonden residuvorming die in de experimenten met gelabelde chloorfenolen gevonden is. Als verklaring hiervoor zijn er verschillende mogelijkheden. Een eerste hypothese is dat microorganismen de vorming van gebonden residu katalyseren en chloorfenolen aan de vaste fase binden (route (1a)). Dat dit niet erg waarschijnlijk is volgt uit de resultaten van anaerobe incubaties en het korte duur experiment. De tweede, meer waarschijnlijke hypothese is dat



Figuur 6.1: Schematische weergave van een model voor de processen die chloorfenolen in de bodem kunnen ondergaan.

de microorganismen chloorfenolen omzetten in produkten die vervolgens, biogekatalyseerd of niet, gebonden worden aan de bodem (routes (1b) en (2)). Een derde mogelijkheid is dat de chloorfenolen en/of produkten zich ophopen en/of ingebouwd worden in de microorganismen en dan als 'schijnbare' gebonden residu gemeten worden.

Het is op dit moment nog niet mogelijk om een volledige massabalans op te stellen voor de afbraak van chloorfenolen. Wel is duidelijk dat een gedeelte (20 % voor 4-MCF en 10 % voor 3,4-DCF) wordt omgezet in CO<sub>2</sub> en dat daarnaast van de afbraakproducten een gedeelte oplosbaar is en een ander gedeelte aan de grond gebonden wordt. Dit kan betekenen dat ten gevolge van biologische activiteit toch vorming van gebonden residu optreedt, maar of dit chloorfenolen of intermediairen betreft is niet bekend. Verder bestaat de mogelijkheid dat de gevormde oplosbare intermediairen uitspoelen naar het grondwater. Er zal nader onderzoek nodig zijn om deze vragen te kunnen beantwoorden.

## HOOFDSTUK 7: CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN.

- Onder steriele en anaerobe omstandigheden vindt geen afname plaats van de concentraties chloorfenolen. Dit betekent dat geen biodegradatie en ook geen vorming van gebonden residuen plaatsvindt onder deze omstandigheden.
- Onder aerobe omstandigheden vindt wel afname van de concentraties chloorfenolen plaats en dit wordt gezien als biologische omzetting.
- De snelheid van afname van de concentraties chloorfenolen onder aerobe omstandigheden is afhankelijk van het chloorfenol (4-MCF > 3-MCF > PCF > 2,3,4,6-TeCF > 3,4-DCF > 2,4,5-TCF) en van de gebruikte grondsoort (Maasdijk > Rolde > Kootwijk > Katwijk).
- De afbraak van 4-MCF en 3,4-DCF betreft geen volledige mineralisatie omdat slechts 20 resp. 10 % wordt teruggevonden als CO<sub>2</sub> (voor de andere chloorfenolen is dit niet getest), terwijl vrijwel alle uitgangsstof is verdwenen. Er worden waarschijnlijk intermediairen gevormd.
- Het is op dit moment nog niet mogelijk om een volledige massabalans op te stellen. Wel is gebleken dat, naast de vorming van CO<sub>2</sub>, een gedeelte van de afbraakproducten aan de grond gebonden wordt en een gedeelte oplost in de waterfase. Mogelijk treedt vorming van gebonden residuen op onder invloed van de biologische activiteit en het betreft dan waarschijnlijk intermediairen die gebonden worden.
- Er zal nader onderzocht moeten worden waarom slechts 20 % van de chloorfenolen wordt omgezet in CO<sub>2</sub> en welke intermediairen worden gevormd en waar deze zich bevinden. Tevens zal onderzocht moeten worden of de andere chloorfenolen hetzelfde gedrag vertonen t.a.v. de CO<sub>2</sub>-productie. Het uiteindelijke doel is een volledige massabalans voor alle chloorfenolen.

LITERATUURLIJST

- Apajalahti, J.H.A. and M.S. Salkinoja-Salonen (1986). "Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*." Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 62-67.
- Berg, R. van den (1989). Gedrag van chloorfenolen in de bodem. Resultaten van het biodegradatieonderzoek. RIVM-rapport no. 728603004. RIVM, Bilthoven.
- Deul, P.C. (1987). Mobiliteit en afbreekbaarheid van chloorfenolen in grond. RIVM-rapport no. 728603002. RIVM Bilthoven.
- Kaufman, D.D. (1978). "Degradation of Pentachlorophenol in Soil, and by Soil Microorganisms." in: Pentachlorophenol, chemistry, pharmacology and environmental toxicology. Plenum Press, New York.
- Murthy, N., D. Kaufman and G.F. Fries (1979). "Degradation of Pentachlorophenol (PCP) in aerobic and anaerobic soil." J. Environ. Sci. Health. B14, 1-14.
- Scheunert, I., Z. Qiao and F. Korte (1982). "Comparative studies of the fate of atrazine-<sup>14</sup>C and pentachlorophenol-<sup>14</sup>C in various laboratory and outdoor soil-plant systems." J. Environ. Sci. Health. B21, 457-485.
- Scheunert, I. (1987). "Behaviour of <sup>14</sup>C-labelled organic industrial chemicals in soil and leached water." In: W. van Duijvenbooden and H.G. van Waageningh (eds.). Vulnerability of soil and groundwater to pollutants. Proceedings and Information. No. 38, TNO Committee on Hydrological Research, The Hague.

Valo, R., J. Apajalahti and M. Salkinoja-Salonen (1985). "Studies on the physiology of microbial degradation of pentachlorophenol." Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 313-319.

Vonk, J.W. (1981). Milieutoxicologisch onderzoek van gechloreerde fenolen. TNO-rapport no. CL 81/34. TNO, Delft.

Vlaardingen, P. van (1988). Biodegradatie in de verzadigde zone van de bodem. Stageverslag, RIVM-EMD Bilthoven.

Weiss, U.M., I. Scheunert, W. Klein en F. Korte (1982). "Fate of pentachlorophenol-<sup>14</sup>C in Soil under Controlled Conditions." J. Agric. Food Chem., 30, 1191-1194.



BIJLAGE:

ROLDE AEROOB

TIJD (dagen)	RECOVERIES (%)					
	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	94	116	93	98	93	73
0	94	120	95	94	92	72
0	100	93	99	102	99	80
3	82	37	89	87	70	48
3	83	43	90	88	72	52
3	83	39	90	87	70	49
7	59	0	76	73	58	44
7	65	0	78	76	58	38
7	62	0	77	73	56	37
14	26	0	74	72	51	42
14	32	0	74	72	48	34
14	26	0	71	68	50	40
22	0	0	62	71	41	31
22	0	0	61	72	48	39
22	0	0	70	82	52	40
29	0	0	45	60	32	24
29	0	0	41	65	44	39
29	0	0	51	72	48	42
42	0	0	17	48	29	30
42	0	0	19	54	33	34
42	0	0	59	80	53	45
58	0	0	6	35	18	20
58	0	0	7	39	23	26
58	0	0	5	36	21	26
80	0	0	0	22	12	15
80	0	0	0	16	7	9
80	0	0	3	22	13	22
100	0	0	0	5	16	3
100	0	0	0	6	11	3
100	0	0	0	9	6	4

ROLDE ANAEROOB

TIJD (dagen)	RECOVERIES (%)						O2 (%)	N2 (%)
	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA		
0	95	120	96	96	93	75		
0	94	117	97	102	96	81		
0	95	94	94	93	93	78		
3	95	88	97	94	84	62	0.2	1.2
3	88	65	94	92	77	55	0.9	4.2
3	93	89	92	89	75	55	0.0	0.2
7	79	75	79	74	63	45	0.0	0.6
7	83	87	80	78	68	53	0.0	0.2
7	70	47	78	72	58	39	0.1	1.9
14	87	88	88	87	78	67	0.0	0.2
14	83	80	85	83	75	61	0.0	0.5
14	90	89	89	87	79	62	0.0	0.2
22	84	73	90	94	86	76	0.0	0.4
22	80	69	88	92	85	76	0.0	0.4
22	84	70	91	95	81	65	0.0	0.5
29	98	93	102	104	95	85	0.0	0.1
29	81	0	100	99	82	59	0.0	3.5
29	88	58	104	103	90	82	0.0	1.4
42	93	88	101	108	96	93	0.1	0.9
42	83	62	95	99	89	79	0.0	1.3
42	90	82	97	103	91	89	0.0	0.3
58	68	0	90	95	79	67	0.2	4.0
58	85	70	91	97	81	66	0.0	0.4
58	84	72	94	99	78	61	0.0	0.8
80	56	0	81	82	56	68	0.8	7.1
80	79	73	87	96	73	57	0.0	0.3
80	78	65	89	98	82	72	0.0	0.7
100	75	75	67	52	48	26	0.0	0.3
100	67	0	73	62	53	30	0.0	2.8
100	80	76	75	67	60	38	0.0	0.3

ROLDE STERIEL

RECOVERIES (%)

DAG	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	96	115	102	108	101	87
0	121	106	108	112	105	89
0	98	94	106	113	105	89
3	101	96	102	102	92	72
3	99	95	100	100	89	68
3	102	98	103	102	90	70
7	85	87	86	83	73	51
7	90	91	91	88	78	59
7	94	95	92	92	80	60
14	97	99	100	96	87	68
14	99	103	100	103	96	83
14	98	105	100	102	91	75
22	92	80	95	94	85	62
22	98	86	107	111	105	93
22	97	88	102	105	89	65
29	107	104	112	114	90	71
29	121	121	125	130	117	100
29	111	109	115	116	83	58
42	102	101	108	115	107	98
42	96	94	103	113	103	99
42	97	94	106	114	105	103
58	96	93	102	111	101	86
58	95	89	99	104	73	53
58	97	94	104	112	104	89
80	94	91	98	106	80	56
80	87	89	94	106	89	72
80	94	91	101	117	103	88
100	92	95	94	96	80	56

KOOTWIJK AEROOB

TIJD (dagen)	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	97	119	103	104	99	81
0	128	109	107	108	102	89
3	83	0	88	85	67	50
3	74	0	80	81	67	51
3	78	0	86	87	71	56
7	68	0	80	80	61	52
7	65	0	76	75	58	48
7	72	0	76	75	56	46
14	58	0	81	82	49	41
14	57	20	81	82	52	43
14	58	0	82	84	57	48
22	47	0	81	86	50	42
22	48	0	81	86	48	36
22	46	0	83	91	54	43
29	40	0	80	84	46	40
29	42	0	79	84	46	39
29	42	0	80	81	44	32
42	39	0	79	84	48	37
42	47	0	80	87	41	35
42	49	0	87	93	46	38
58	27	0	71	79	47	31
58	33	0	75	83	46	32
58	46	0	83	95	45	34
80	19	0	65	73	45	27
80	21	0	67	75	44	26
80	26	0	65	72	42	26
100	0	0	56	63	42	23
100	0	0	54	66	44	25
100	0	0	54	62	38	19



KOOTWIJK STERIEL

TIJD (dagen)	RECOVERIES (%)					
	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	103	131	114	121	109	98
0	109	149	120	124	114	103
0	106	134	117	121	110	102
3	87	77	89	90	84	67
3	96	95	103	102	93	81
3	95	91	103	103	93	77
7	88	87	90	88	82	68
7	89	90	91	89	80	66
7	88	88	91	88	80	66
14	91	82	98	96	90	74
14	95	89	103	102	98	87
14	99	89	106	102	96	80
22	98	99	105	107	95	83
22	101	107	109	111	99	81
22	102	109	113	121	114	104
29	108	119	120	127	115	115
29	106	116	119	124	111	110
29	103	112	117	120	113	110
42	100	97	112	119	109	109
42	100	95	111	118	107	107
42	99	97	110	117	105	106
58	99	95	110	121	107	103
58	96	89	107	111	87	72
58	98	95	110	121	109	101
80	93	91	101	114	99	89
80	95	91	103	116	102	92
80	101	109	108	117	93	77
100	97					

MAASDIJK AEROOB

TIJD (dagen)	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	102	111	106	108	97	72
0	104	103	105	105	93	69
0	94	105	100	102	92	71
3	55	0	73	73	50	30
3	52	0	69	66	46	27
3	55	0	72	69	49	30
7	40	0	61	58	35	21
7	34	0	52	50	32	21
7	37	0	56	54	33	20
14	17	0	37	38	21	11
14	18	0	42	43	27	16
14	19	0	41	40	21	11
22	0	0	34	37	17	9
22	0	0	30	34	16	8
22	0	0	36	40	19	10
29	0	0	27	32	19	10
29	0	0	27	33	18	11
29	0	0	28	33	18	10
42	0	0	16	22	13	7
42	0	0	18	25	14	7
42	0	0	18	24	14	7
58	0	0	10	17	11	5
58	0	0	16	23	14	6
58	0	0	10	18	11	5
80	0	0	5	12	7	4
80	0	0	5	11	7	4
80	0	0	5	12	7	3
100	0	0	4	11	7	3
100	0	0	4	12	7	0
100	0	0	13	24	16	6

MAASDIJK ANAEROOB

TIJD (dagen)	RECOVERIES (%)						O2 (%)	N2 (%)
	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA		
0	93	115	101	104	90	69		
0	91	107	100	102	88	67		
0	101	122	107	108	95	69		
3	83	81	85	82	68	50	0.0	0.3
3	77	48	84	79	63	46	0.0	1.6
3	82	79	82	77	63	45	0.0	0.9
7	75	52	77	71	57	42	0.7	1.8
7	84	87	79	73	60	44	0.0	0.4
7	81	86	50	69	58	43	0.0	0.0
14	82	84	83	83	69	58	0.0	0.5
14	80	80	82	81	72	63	0.0	0.4
14	77	75	81	80	71	61	0.0	0.2
22	86	87	94	94	88	78	0.0	0.5
22	85	82	89	90	82	73	0.0	0.0
22	76	63	83	83	73	65	0.0	0.8
29	75	71	83	83	71	65	0.0	0.9
29	77	81	81	79	62	50	0.0	0.2
29	76	76	79	80	70	60	0.0	0.5
42	72	59	79	79	68	63	0.0	1.1
42	69	0	79	80	67	60	0.0	2.1
42	78	77	83	82	73	66	0.0	0.4
58	75	50	77	80	68	60	0.0	1.3
58	77	64	78	80	71	63	0.0	0.4
58	80	67	79	82	73	63	0.0	0.6
80	74	69	75	77	60	50	0.0	0.3
80	72	71	75	78	66	54	0.3	1.2
80	74	70	77	81	69	58	0.0	0.0
100	74	67	8	92	75	64	0.0	0.2
100	69	45	72	82	65	56	0.0	5.0
100	76	61	79	96	74	68	0.0	1.8



MAASDIJK STERIEL

TIJD (dagen)	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	104	92	111	114	97	73
0	100	116	107	111	99	72
0	113	84	102	127	108	93
3	92	91	94	91	75	47
3	90	89	91	87	69	41
3	92	93	94	91	74	45
7	106	113	106	107	85	59
7	92	98	91	89	74	50
7	96	102	98	98	78	54
14	88	87	93	93	85	63
14	89	91	89	85	61	22
14	86	85	90	88	77	51
22	93	95	98	98	76	49
22	96	101	104	108	93	68
22	98	99	106	110	96	72
29	92	100	97	101	90	72
29	87	98	93	95	77	54
29	89	97	97	101	88	68
42	90	94	97	102	91	73
42	88	91	96	101	87	67
42	93	97	101	107	89	74
58	94	94	100	113	93	73
58	90	84	99	108	91	68
58	92	91	99	107	92	66
80	89	94	96	107	88	63
80	91	93	99	110	91	65
80	91	95	100	109	88	60

KATWIJK AEROOB

TIJD (dagen)	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	104	123	110	76	72	70
0	102	83	103	103	102	98
0	140	73	107	106	103	92
3	85	78	84	84	84	83
3	88	81	88	88	86	87
3	88	81	86	89	89	86
7	92	74	83	82	85	83
7	77	60	71	73	75	73
7	94	76	86	85	87	83
14	84	54	76	77	83	75
14	85	52	72	73	80	72
14	89	53	77	79	85	75
22	79	0	69	77	85	83
22	85	0	75	86	94	91
22	83	0	73	80	89	86
29	78	0	68	80	86	84
29	77	0	67	81	92	90
29	80	0	69	84	96	94
42	69	0	51	66	82	76
42	78	0	57	72	88	80
42	79	0	57	73	93	84
58	63	0	39	59	79	70
58	65	0	42	64	84	74
58	59	0	37	57	78	72
80	51	0	30	57	87	90
80	50	0	28	56	87	88
80	49	0	27	54	83	82
100	44	0	20	50	84	88
100	40	0	17	44	78	82
100	41	0	19	49	84	87

KATWIJK ANAEROOB

TIJD (dagen)	RECOVERIES (%)						O2 (%)	N2 (%)
	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA		
0	106	119	108	107	101	91		
0	91	107	96	95	92	88		
0	93	111	96	95	97	90		
3	95	95	96	95	92	90	0.0	0.0
3	93	54	93	93	90	87	0.0	0.0
3	96	96	96	94	93	88	0.0	0.3
7	96	96	90	90	90	85	1.5	5.6
7	96	94	89	86	86	83	0.0	0.0
7	96	97	90	90	90	88	0.0	0.0
14	95	104	86	81	83	74	0.0	0.0
14	95	98	86	85	86	78	1.0	4.1
14	95	103	86	83	84	76	0.0	0.2
22	103	93	104	105	106	97	0.2	0.6
22	94	85	93	94	93	88	1.8	7.4
22	93	89	90	92	92	87	0.2	0.7
29	94	93	92	95	97	94	0.0	0.5
29	92	94	92	96	99	96	0.0	0.0
29	93	69	88	90	95	89	0.9	3.9
42	83	41	75	87	86	77	4.5	17.1
42	97	95	92	95	95	86	0.1	0.5
42	90	89	87	91	93	89	0.1	0.5
58	93	82	85	90	107	80	0.2	0.9
58	100	99	97	109	105	97	0.0	0.2
58	91	96	86	96	99	86	0.0	0.4
80	85	71	84	98	96	93	0.3	1.0
80	86	76	85	98	95	92	0.0	0.1
80	83	42	79	96	96	94	0.5	1.7
100	94	71	88	110	106	103	0.2	0.6
100	63	0	49	89	102	103	3.8	14.0
100	93	82	91	112	105	104	0.0	0.0

KATWIJK STERIEL

TIJD	RECOVERIES (%)					
(dagen)	3-MONO	4-MONO	3,4-DI	TRI	TETRA	PENTA
0	126	71	105	100	98	91
0	94	81	99	99	96	95
0	94	113	102	102	101	91
3	87	88	89	89	86	85
3	88	88	91	92	90	89
3	88	90	90	89	87	84
7	96	101	93	90	89	87
7	98	104	93	90	91	87
7	95	100	90	86	88	83
14	95	110	95	92	89	81
14	93	104	89	85	84	77
14	94	105	92	88	87	82
22	99	100	98	99	98	92
22	98	99	96	94	92	86
22	96	96	95	91	91	85
29	100	102	99	100	99	96
29	100	101	101	101	101	95
29	95	101	95	96	95	92
42						
42	108	116	101	100	95	84
42	104	111	97	94	88	82
58	90	92	86	85	85	79
58	89	92	88	90	88	84
58	87	101	95	108	107	106
80	92	95	92	93	94	90
80	96	95	95	103	101	97
80	90	90	89	91	92	85