

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

HOOFDGROEP MAATSCHAPPELIJKE TECHNOLOGIE TNO

Rapportnummer 728518002.

In-situ biorestauratie van een met olie
verontreinigde bodem.
Resultaten van het laboratoriumonderzoek.

R.van den Berg
D.H.Eikelboom 1)
J.H.A.M.Verheul

november 1987.

1) TNO

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het Directoraat-
Generaal voor de Milieuhygiene, Directie Bodem, Water en Stoffen,
Hoofdafdeling Bodem (opdrachtbevestiging 122858 d.d. 12 oktober 1984).

Verzendlijst

- 1 - 3 Directeur van de Hoofdafdeling Bodem van het Directoraat-Generaal voor de Milieuhygiëne, Directie Bodem, Water, Stoffen.
- 4 Secretaris-Generaal van het Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur.
- 5 Directeur-Generaal voor de Milieuhygiëne van het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.
- 6 Plv. Directeur-Generaal voor de Milieuhygiëne van het Ministerie van Volksgezondheid, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.
- 7 - 8 Het hoofd van de afdeling Biologie van de Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie van TNO.
- 9 Directie RIVM
- 10 dr.ir.T.Schneider
- 11 ir.Tj.Hofker
- 12 ir.N.D.van Egmond
- 13 - 15 Auteurs
- 16 - 17 LBG/SGO
- 18 - 19 Rapporten- en Projectregistratie
- 20 - 75 Reserve

Inhoud

blz.

	Samenvatting	1
1	Inleiding	4
2	Materiaal en methoden	7
	2.1 Materialen	7
	2.1.1 Bodemmateriaal	7
	2.1.2 Entmateriaal	7
	2.1.3 Benzine	8
	2.1.4 Nutriëntenoplossingen	8
	2.1.5 Detergenten	8
	2.2 Methoden van onderzoek	8
	2.2.1 Biodegradatie-experimenten	8
	2.2.2 Uitloogexperimenten	11
	2.3 Analyses	12
3	Bioafbreekbaarheidsonderzoek	13
	3.1 Resultaten van de biologische afbraakproeven	13
	3.2 Discussie	23
	3.2.1 Invloed van stikstof en fosfaat in concentratie en vorm	23

	3.2.2	Invloed van het toevoegen van olie-afbrekende micro-organismen	23
	3.2.3	Invloed van pH, vochtgehalte en temperatuur	24
	3.2.4	Limitatie in de zuurstofbeschikbaarheid	25
	3.2.5	Invloed van de aanwezigheid van detergenten	26
	3.2.6	Activiteit van de biomassa	26
	3.2.7	Afbraaksnelheid en massabalans	27
	3.3	Conclusies	30
4		Uitloogexperimenten	32
	4.1	Resultaten van de uitloogproeven	32
	4.1.1	Invloed van het percolatiedebiet en de benzineconcentratie	32
	4.1.2	Invloed van detergenten	33
	4.1.3	Invloed van fosfaat en de historische verontreiniging	34
	4.1.4	Massabalans	35
	4.2	Discussie	36
	4.3	Conclusies	40
5		Eindconclusies en aanbevelingen	41
6		Gerefereerde literatuur en basismateriaal	43
		Tabellen 1 t/m 3	45

Figuren 1 t/m 39

47

Bijlage 1. Biodegradatietoetsen

71

Bijlage 2. Uitloogexperimenten

73

Bijlage 3. Analysemethoden

74

Voorwoord

Dit rapport is een deelrapport van het project 'In situ bio restauratie van een met olie verontreinigde bodem'. Dit project is door het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer (DGMH projectnr. 31022) opgedragen aan het Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM projectnummer 728518) in samenwerking met de hoofdgroep Maatschappelijke Technologie van TNO (TNO projectnr. 12104).

In het kader van dit project zijn twee andere rapporten uitgebracht.

* TNO rapport nr. R85/320

In situ bio restauratie van een met olieprodukten verontreinigde ondergrond. Een literatuurstudie.

D.H. Eikelboom.

* RIVM rapport nr. 728518001

In situ bio restauratie van een met olie verontreinigde bodem. Nader onderzoek rapport.

J.H.A.M. Verheul, D.H. Eikelboom en R. van den Berg.

Aan het onderzoek beschreven in dit rapport is bijgedragen in de vorm van de uitvoering van experimenten en analyses door:

A. Hoogeveen (TNO), I. Kokkelink (stagiaire Ant.v.Leeuwenhoek Instituut-Delft), R. Koster (TNO), I. Rijsdorp (stagiaire R.U. Leiden), P. Slingerland (RIVM-LOC) en M.E. Visser (stagiaire R.U. Leiden).

Het rapport is op 16 oktober 1987 besproken in de begeleidingscommissie van het project.

Samenvatting.

In het project 'In situ biorestauratie van een met olie verontreinigde bodem' wordt in een aantal fasen de haalbaarheid van biologische in situ reiniging beoordeeld.

In laboratoriumbiodegradatie-experimenten is onderzocht hoe groot de afbraakcapaciteit was van de met benzine verontreinigde locatie, die als proefobject geselecteerd was, en hoe de afbraak gestimuleerd zou kunnen worden.

In de Asten grond was sprake van een lage microbiële activiteit welke niet toenam tijdens de afbraak. Activering van de biomassa door toevoegen van entmateriaal gaf de beste afbraakresultaten, maar lijkt praktisch - gezien de retentie van micro-organismen in de grond - niet haalbaar. Stimulering vond ook plaats door toevoegen van de goed afbreekbare verbinding natriumacetaat, waarbij de biomassa(activiteit) en daarmee de afbraak (tijdelijk) verhoogd werd. Stimulering van de afbraak werd geconstateerd in de aanwezigheid van voldoende vocht (waterverzadiging) en een neutrale pH (door juiste keuze van een fosfaatbuffer). Dosering van stikstof en fosfor was noodzakelijk. Voor de uitgevoerde experimenten was een C-N-P verhouding van 100-10-10 optimaal, waarbij de hoge fosfaat dosering noodzakelijk was vanwege de binding van fosfaat aan de grond. In doorstroomsystemen kan de N en P dosering afhankelijk van het verbruik ingesteld worden. Als stikstofbron werden NH_4NO_3 en KNO_3 het meest geschikt bevonden. Het gebruik van nitraat als alternatieve zuurstofbron leidde tot gelijke of bij hoge concentraties nitraat meestal lagere afbraaksnelheden. Waterstofperoxide bleek een geschikt alternatief in de zin dat gelijke

of hogere afbraaksnelheden werden gemeten. Alleen bij beginconcentraties waterstofperoxide boven 100 mg.kg^{-1} werd toxiciteit waargenomen.

Uit de biodegradatie-experimenten werden de volgende afbraaksnelheden geschat voor drie karakteristieke toetscondities: onder natuurlijk heersende condities $1-2 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$; waterverzadigd, geen verdere stimulering $3-4 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$; en optimaal ingesteld inclusief percolatie $10 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, met een range van $5-40 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. In hoeverre deze in laboratoriumexperimenten gemeten afbraaksnelheden haalbaar zijn in het veld zal uit kolomexperimenten moeten blijken.

Door massabalans onderzoek, waarbij lage recovery's (gemiddelden van de verschillende testseries: 2-80 %) werden gemeten, kwam vast te staan dat de afbraak waarschijnlijk in de meeste proeven gestopt was vanwege het niet langer beschikbaar zijn van de benzinecomponenten als gevolg van vervluchtiging van deze componenten naar de gasfase. In de gebruikte proefopzet was de beschikbaarheid voor de afbraak een functie van: wateroplosbaarheid en oplossnelheid, mate en snelheid van vervluchtiging en diffusie van gas- naar waterfase.

De beschikbaarheid van de benzinecomponenten bij doorstromen van grond (onder uitsluiting van vervluchtiging) is onderzocht door middel van uitloogexperimenten. In uitloogproeven is vastgesteld dat de benzinecomponenten, aanwezig als mobiele restverzadiging in de grond, slechts langzaam beschikbaar komen in de waterfase en uitspoelen. Na een eerste fase van 5 dagen met piekconcentraties van $100-200 \text{ mg C.l}^{-1}$ nam de uitspoeling af naar een snelheid van maximaal $5 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. De uitspoeling bleek in de loop van de tijd af te nemen, maar tot welke waarden kon vanwege de beperkte duur van de proeven niet worden

vastgesteld. Op basis van de combinatie van de factoren historische verontreiniging en verminderde uitspoeling van slecht wateroplosbare componenten mag in de praktijk een lagere uitspoelingssnelheid verwacht worden.

De mobiliteit van de benzinecomponenten werd niet bevorderd door het toepassen van detergenten, mede vanwege verstopping van de grond.

Gezien de geconstateerde beperkte uitspoelbaarheid van de benzinecomponenten in de Asten grond, is het waarschijnlijk dat de beschikbaarheid van de benzinecomponenten de snelheidsbeperkende stap voor de afbraak zal vormen.

1 Inleiding.

De laatste tien jaar zijn in Nederland enkele duizenden gevallen ontdekt van meer of minder ernstige bodemverontreiniging. Op dit moment is de stand van zaken dat ongeveer 1600 terreinen in het kader van de Interimwet Bodem Sanering in aanmerking komen voor sanering. Diverse fysische en fysisch-chemische reinigingstechnieken zijn ontwikkeld of in ontwikkeling. De capaciteit van micro-organismen om een grote variëteit aan organische stoffen te transformeren heeft geleid tot onderzoek naar de mogelijkheden van biologische bodemreiniging. Met name met landfarming is al veel ervaring opgedaan.

Aangezien een belangrijk deel van de kosten bij reiniging het afgraven van de grond voor behandeling betreft, zou het ter plaatse (in situ) behandelen van de grond tot een aanzienlijke kostenreductie kunnen leiden. Dit geldt met name voor verontreinigingen in diepere grondlagen of onder bebouwing.

Door het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer is aan het Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne in samenwerking met de hoofdgroep Maatschappelijke Technologie van TNO een opdracht gegeven om de mogelijkheden te onderzoeken van een biologische reiniging in situ. Doel van het onderzoek is na te gaan of een in situ biologische reiniging kan worden uitgevoerd en zo ja, op welke wijze, tegen welke kosten en met welke tijdsduur.

Als verontreiniging is gekozen voor een olieverontreiniging, omdat:

. een groot aantal locaties in Nederland met olie verontreinigd is en deze olieverontreinigingen het grondwater en daarmee de eventuele

drinkwatervoorziening bedreigen, en

. olie uit componenten bestaat die in principe biologisch afbreekbaar zijn.

Het onderzoek is in een drietal fasen ingedeeld:

Fase 1. Het literatuuronderzoek en de selectie van de proeflocatie.

Fase 2. Biodegradatieonderzoek in batchsystemen en op pilot plant schaal in RVS kolommen; Uitspoelingsonderzoek in doorstroomsystemen; Nader Onderzoek van de locatie.

Fase 3. Inrichting en sanering van de locatie.

Fase 1 is eind 1985 afgesloten met het verschijnen van het rapport 'In Situ Biorestauratie van een met olieprodukten verontreinigde ondergrond. Een literatuurstudie' van Eikelboom (1985) en met de keuze van de proeflocatie.

Uit de literatuurstudie kan worden geconcludeerd dat een biologische in situ behandeling redelijke perspectieven biedt en in een viertal gevallen met wisselend succes is toegepast. Verder werd aangetoond dat de beïnvloeding van de abiotische milieuomstandigheden in de ondergrond, ten behoeve van de stimulering van afbraak, technisch uitvoerbaar is.

Als proeflocatie is na een zorgvuldige afweging gekozen voor een verontreiniging onder een benzinstation te Asten (N.Br.). Voor details over de verontreiniging, verspreiding in tijd en ruimte, en de locatie wordt verwezen naar het Nader Onderzoek Rapport (Verheul e.a. 1987).

In dit rapport worden de resultaten besproken van het

laboratoriumonderzoek: de biodegradatie-experimenten en de uitloogexperimenten. Beide maken deel uit van fase 2 van het onderzoek. Over de kolomproeven op pilot plant schaal zal apart worden gerapporteerd.

Het doel van de biodegradatie-experimenten was na te gaan hoe groot de afbraakcapaciteit van de verontreinigde grond is en in hoeverre deze door wijziging van (a)biotische omstandigheden zou kunnen worden gestimuleerd. De resultaten van de biodegradatie-experimenten zullen worden gebruikt om de opzet vast te stellen van de RVS kolomexperimenten.

In de biodegradatie-experimenten zijn de volgende effecten onderzocht: C-N-P verhouding, vorm van de stikstofbron, toevoegen van olie-afbrekers, pH, vocht, temperatuur, zuurstofbron, toevoegen van detergenten en de toxiciteit van de verontreiniging.

De beschikbaarheid voor afbraak van de immobiele restverzadiging benzine is onderzocht door de uitvoering van uitloogproeven. Naast de invloed van de concentratie van de verontreiniging en de percolatiesnelheid, is geprobeerd de beschikbaarheid van de benzinecomponenten te verhogen door toevoegen van detergenten.

2 Materiaal en methoden.

2.1 Materialen.

2.1.1 Bodemmateriaal. Als bodemmateriaal voor de uitloogproeven en de biodegradatieproeven is gebruik gemaakt van schone en verontreinigde grond van de locatie te Asten. Het bodemmateriaal te Asten bestaat uit middelfijn zand, waarin leem/klei lagen voorkomen. De grond bevat minder dan 0.05 % organische koolstof of stikstof. Voor verdere beschrijving van dit materiaal wordt verwezen naar het Nader Onderzoek Rapport (Verheul e.a. 1987). Het materiaal werd verzameld in september 1985 (concentratie benzine 800 mg C.kg⁻¹, waarbij door homogeniseren een deel van de benzine verdampt bleek te zijn), januari 1986 (1300 mg C.kg⁻¹), maart 1986 (3500 mg C.kg⁻¹), april 1986 (2600-4900 mg C.kg⁻¹), juni 1986 (1600 mg C.kg⁻¹), augustus 1986 (700 mg C.kg⁻¹), oktober 1986 (5400-12000 mg C.kg⁻¹) en november 1986 (2200 mg C.kg⁻¹). Het bodemmateriaal dat tot en met maart 1986 bemonsterd werd, werd om verdamping van benzine te voorkomen bewaard bij -20 °C tot het gebruikt werd voor de afbraakproeven.

2.1.2 Entmateriaal. In de biodegradatie-experimenten is gebruik gemaakt van twee soorten entmateriaal. KONI grond is grond afkomstig van een landfarm van een met snijolie (500 - 1500 mg.kg⁻¹) verontreinigde kleigrond (op het TNO terrein). Als tweede entmateriaal is gebruik gemaakt van geïsoleerde benzine afbrekers, opgekweekt in minimaal medium + benzine (0.01 ml.ml⁻¹), dat geënt werd met grond, afkomstig van een FINA benzinetankstation.

2.1.3 *Benzine*. Naast de experimenten met de Asten grond, die met normaal benzine verontreinigd was, zijn proeven uitgevoerd met schone grond die proefafhankelijk kunstmatig werd verontreinigd met normaal benzine van het merk Aral.

2.1.4 *Nutriëntenoplossingen*. Afhankelijk van de opzet van de proef zijn nutriëntenoplossingen bereid door oplossen van de stoffen in demi-water.

2.1.5 *Detergenten*. Bij enkele van de biodegradatie-experimenten, maar voornamelijk bij de uitloogexperimenten is gebruik gemaakt van een zestal detergenten, die als representanten van bepaalde groepen gekozen zijn. Bij de keuze van de detergenten is als eis gesteld dat ze biologisch afbreekbaar moesten zijn om geen nieuwe verontreiniging in de ondergrond te creëren. De biologische afbraak is getoetst met de OECD screeningstest en de gegevens hiervan staan in tabel 1 samen met de indeling van de detergenten.

2.2 Methoden van onderzoek.

2.2.1 Biodegradatie-experimenten.

In biodegradatie-experimenten werd de afbraak van benzine(componenten) door micro-organismen onderzocht. Aan grond met de autochtone micro-organismenpopulaties werd een nutriëntenoplossing toegevoegd en de afbraak gevolgd gedurende enkele weken incubatie onder standaardcondities (20 °C, donker). De pH gedurende de experimenten lag

in het algemeen tussen 4.5 en 5.5. In de gebufferde experimenten werden pH's van 7.2-7.6 gemeten. De benzine was meestal aanwezig in de grond als verontreiniging of werd vers aan de nutriëntenoplossing of aan schone grond toegevoegd. De toevoer van substraat was in het algemeen eenmalig, maar in enkele experimenten is meermalen gedoseerd. De afbraak is gevolgd aan de hand van het zuurstofverbruik, de kooldioxideproductie en in enkele gevallen de analyse van specifieke benzinecomponenten. Aangezien een volledige mineralisatie gewenst werd, was meting van de kooldioxideproductie de meest optimale parameter.

De biodegradatieproeven zijn in drie verschillende opzetten uitgevoerd:

- a. Sapro-mat test (-O₂-M test): meting van het zuurstofverbruik via bepaling van de electrolytische zuurstofproductie na drukverlaging door consumptie;
- b. Batch testen met meting van de kooldioxideproductie door middel van
 1. titratie van in loog geabsorbeerde kooldioxide (-CO₂-T test); of
 2. directe infrarood meting van de kooldioxide in de gasfase (-CO₂-I test).

De methoden zijn meer in detail beschreven in bijlage 1.

De optimale vorm van N dosering en verhouding van de NP dosering ten opzichte van de aanwezige C werd onderzocht door in de nutriëntenoplossing verschillende vormen van N: KNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl of (NH₄)₂SO₄ en in verschillende verhoudingen C-N-P toe te voegen.

Door toevoegen aan de grond(suspensie) van actief olie-afbrekende micro-organismen in de vorm van KONI landfarm grond, uit FINA grond geïsoleerde olie-afbrekers of geïncubeerde verontreinigde Asten grond,

werd onderzocht of de afbraaksnelheid verhoogd kon worden door deze toevoeging. Door middel van het toevoegen van natriumacetaat is geprobeerd de activiteit van de autochtone biomassa te verhogen.

Proeven bij een verschillend vochtgehalte (20 % van de waterverzadiging tot grondsuspensies) leverden informatie op over het effect van het vochtgehalte; het bufferen van de nutriëntenoplossing informatie over het effect van de pH.

Of de zuurstofbeschikbaarheid de afbraak(snelheid) beïnvloedde en welke alternatieve zuurstofbronnen mogelijk waren, is onderzocht door schuddend versus stilstaand incuberen en toepassing van alternatieve zuurstofbronnen: waterstofperoxide en nitraat.

Als mogelijkheid om de beschikbaarheid van benzine te verhogen en daarmee de afbraaksnelheid, werd in een onderzoek het effect van het toevoegen van niet-persistente detergenten nagegaan.

Het voorafgaande onderzoek en de daarin waargenomen afbraaksnelheden gaven aanleiding tot twee vragen met betrekking tot de activiteit van de micro-organismen:

1. hoe is de activiteit van de biomassa in deze grond;
2. wordt de activiteit geremd door een toxisch effect van de aanwezige benzine ?

De activiteit van de biomassa in schone Asten grond ten opzichte van verschillende substraten, waaronder benzine, is vergeleken met die van andere bodems. De toxiciteit is onderzocht door vergelijking van de afbraakresultaten van natriumacetaat met schone en verontreinigde Asten grond.

2.2.2 Uitloogexperimenten.

Uitloogexperimenten werden uitgevoerd door een kolom grond continu te doorstromen met een nutriëntenoplossing. Door vergelijking van de uitgespoelde organische koolstof gehalten van een verontreinigde en een schone kolom werd de beschikbaarheid van de verontreiniging beoordeeld. In enkele gevallen zijn het effluent en de grond uit de kolom geanalyseerd op benzinecomponenten. De verontreiniging met benzine werd kunstmatig aangebracht. De grondwaterspiegel werd aangebracht onder de laag verontreinigde grond op het scheidingsvlak met schone grond, als simulatie van de situatie in de realiteit. In de uitloogexperimenten is het effect van de percolatiesnelheid, de concentratie van de benzineverontreiniging en de aanwezigheid van detergenten onderzocht. In een tweede serie experimenten is het uitlooggedrag van een met benzine verzadigde grond onderzocht. Hierbij werd gepercoleerd met een oplossing met variërende fosfaatconcentraties om te onderzoeken of fosfaat in staat is de benzinecomponenten te mobiliseren. De gebruikte kolommen hadden kleinere dimensies dan in de eerste serie experimenten en werden op de locatie gestoken in schone grond en later kunstmatig verzadigd met benzine. Ter vergelijking werd één gepakte kolom met historisch verontreinigde grond meegenomen. De percolatie vond zodanig plaats dat de kolom waterverzadigd werd.

2.3 Analyses.

Afhankelijk van het monster zijn de volgende analyses uitgevoerd, waarvan de gedetailleerde voorschriften in bijlage 3 opgenomen zijn: opgelost organisch koolstof (DOC), nitraat en nitriet en benzinecomponenten in water en grond.

3 Bioafbreekbaarheidsonderzoek.

3.1 Resultaten van de biologische afbraakproeven.

Achtereenvolgend is een aantal bioafbreekbaarheidstoetsen uitgevoerd waarbij steeds op basis van de verkregen resultaten een nieuwe opzet gekozen werd. Doel van het onderzoek was te bepalen hoe en in welke mate de microbiële afbraaksnelheid van de benzineverontreiniging in de Asten grond gestimuleerd zou kunnen worden.

In alle figuren betreffende de afbraakexperimenten staat de cumulatieve afbraak, gemeten als kooldioxideproductie of zuurstofverbruik, weergegeven als functie van de incubatietijd. Afbraaksnelheid en -niveau zijn dus synoniem met kooldioxideproductiesnelheid en -niveau of zuurstofverbruikssnelheid en -niveau. Als blanco wordt voor de toetsen het nalaten van behandelingen bedoeld, anders dan hetgeen omschreven is als basis voor de test, zoals in de tekst bij de figuren. De blanco kooldioxideproductie en het blanco zuurstofverbruik van niet verontreinigde grond waren, zoals op basis van de organisch koolstofgehalten (beneden detectieniveau) verwacht mocht worden, erg laag. De blanco's in de figuren 8 en 9 geven voorbeelden hiervan.

Als eerste fase van het onderzoek werden experimenten uitgevoerd om de optimale C-N-P verhouding vast te stellen. Als micro-organismen een stof afbreken en groeien, zijn naast koolstof, stikstof en fosfor nodig voor de opbouw van de biomassa. Afgeleid van de samenstelling van de biomassa wordt in het algemeen een C-N-P verhouding van 100-10-1 aangehouden.

Het onderzoek is uitgevoerd door proeven in te zetten met verschillende C-N-P verhoudingen (C-N van 100-1 tot 1-1 en C-P van 500-1 en 100-1). Daarnaast is ook de vorm van de N bron gevarieerd. Als N bron zijn KNO_3 , NH_4NO_3 en NH_4Cl in de CO2-T test en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in de O2-M en CO2-I test gebruikt.

In de figuren 1 t/m 4. zijn de resultaten van het onderzoek gegeven, waarbij de resultaten van de figuren 1 t/m 3 van de CO2-T test zijn en die van figuur 4 van de O2-M test. Hoewel de resultaten niet eenduidig waren, kunnen de volgende conclusies getrokken worden.

In geen der gevallen werd een exponentiële afbraak, die het gevolg is van een groei van de biomassa op het substraat, waargenomen. Steeds was sprake van een lineaire afbraak in de tijd, duidend op de een of andere vorm van limitatie van de groei. Opvallend is dat de C-N-P verhouding van 500-500-1 aanleiding gaf tot de laagste afbraakniveaus en -snelheden. En bij een C-P verhouding van 500-1 leek een plateau bereikt te worden. De plateaus zouden erop kunnen duiden dat lagere C-P verhoudingen voor een verhoging van de afbraak hadden kunnen zorgen als nog benzinecomponenten aanwezig waren. Een verklaring in de zin van een te hoge N dosering ten opzichte van C of P, of een te lage P dosering volgde niet uit het totaal van de resultaten. Opname van fosfaat door de grond kon hiervoor een verklaring zijn. Een C-N verhouding die varieerde tussen 1 en 100 beïnvloedde de resultaten nauwelijks.

Met NH_4Cl als N bron werden in het algemeen lagere afbraaksnelheden en -niveaus bereikt. Met NH_4NO_3 als N bron vielen de afbraaksnelheden en -niveaus voor alle C-N-P verhoudingen behalve 500-500-1 binnen een zeer kleine range, terwijl dit voor de andere N bronnen duidelijk anders was. De hoogste afbraaksnelheid werd waargenomen met KNO_3 als N bron en een

C-N-P verhouding van 100-100-1: $8 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

De resultaten van de O2-M test (figuur 4) lagen redelijk dicht bij elkaar, behalve wanneer spore-elementen waren toegevoegd. De lineaire afbraak leidde omgerekend op C-basis tot lagere omzettingen ten opzichte van die in de CO2-T test. Een verklaring hiervoor werd niet gevonden, temeer daar juist het omgekeerde mocht worden verwacht.

Als vervolg op de resultaten in de O2-M test werd geprobeerd in hoeverre de afbraak te stimuleren was. Uit figuur 4 blijkt dat toevoegen na 23 dagen van vocht en/of entmateriaal (KONI grond) tot hogere afbraaksnelheden leidde in vergelijking met de blanco. Buffering tot pH 7 leidde niet tot betere resultaten. Als gevolg hiervan werd, in aansluiting op de wijze van uitvoering van de CO2-T test, besloten bij de O2-M testmethode verder met waterverzadigd bodemmateriaal te werken. Bij herhaling van de proef met de O2-M testmethode werd getoetst onder toevoegen van KONI grond als entmateriaal. Opnieuw werd alleen een lineaire afbraak waargenomen (figuur 5). Verder was sprake van een gelijke afbraaksnelheid onafhankelijk van de toegepaste C-N-P verhoudingen.

In een volgende proef (CO2-T toets) werden de effecten van buffering en toevoegen van entmateriaal onderzocht. De van nature zure grond (pH 4.5-5.0) werd hiertoe op pH 7.2 gebracht met een fosfaatbuffer (gebaseerd op een C-N-P verhouding van 100-10-1), terwijl als entmateriaal 10 ml.kg^{-1} van een opgekweekte FINA grond werd gebruikt.

Figuur 6 toont dat de hierbij gebruikt ent niet of nauwelijks tot een verhoogde afbraaksnelheid leidde. De afbraak was lineair in de tijd en

onafhankelijk van de N bron werden ongeveer dezelfde afbraaksnelheden bereikt. De afbraak werd duidelijk gestimuleerd door het bufferen van het bodemmateriaal. Uit metingen tijdens de proeven waarvan de resultaten in de figuren 1 t/m 3 en 6 gegeven zijn, bleek dat bij buffering de opgelost organisch koolstof concentraties ongeveer vier maal hoger lagen ten opzichte van de diverse C-N-P doseringen zonder buffering. De opgelost organisch koolstof concentraties varieerden in het algemeen van 30 tot 50 mg C.l^{-1} met incidentele uitschieters naar 100 mg C.l^{-1} , maar waren 250 tot 300 mg C.l^{-1} in de gebufferde proeven. Of dit een gevolg was van een verhoogde oplosbaarheid van de benzinecomponenten of van het in oplossing gaan van bijvoorbeeld humuszuren, is niet gemeten, maar vooralsnog lijkt dit tweede het meest waarschijnlijk. Hoe dit dan uitwerkt op de oplosbaarheid en afbraak van benzine is niet bekend.

Uit deze proef volgde ook, dat het niet toevoegen van extra N en P aan de grond leidde tot lagere afbraaksnelheden, waaruit blijkt dat N-P dosering noodzakelijk was.

Twee belangrijke vragen die tijdens de eerste proeven geformuleerd werden, waren: 1. in hoeverre treedt remming op van de afbraak onder invloed van de aanwezige benzinecomponenten (toxiciteit) en 2. hoe is de microbiële activiteit van de Asten grond in vergelijking met andere gronden en op andere substraten? Dit laatste vooral met het oog op het ontbreken van de exponentiële afbraakfase bij de diverse experimenten.

Ter beantwoording van de eerste vraag zijn een tweetal proeven uitgevoerd: herhaald toevoegen van benzine en het effect van de aanwezigheid van benzine op de afbreekbaarheid van een goed afbreekbare

verbinding. Figuur 7 (CO₂-T test) toont het resultaat van het herhaald toevoegen van benzine en/of nutriënten. Na een initieel hogere afbraaksnelheid in geval van de benzinetoevoegingen werd een fase bereikt van gelijke afbraaksnelheden. Het toevoegen van de benzine leek de populatie niet te beïnvloeden. In figuur 8 (CO₂-T test) is de afbraak van ondermeer natriumacetaat weergegeven in de aan- en afwezigheid van benzine. De afbraak van natriumacetaat werd niet beïnvloed door de aanwezige benzine. Figuur 9 (CO₂-T test) toont daarentegen dat getoetste detergenten sneller werden afgebroken in schone dan in verontreinigde grond. Mogelijk speelde de toxiciteit van de benzinecomponenten een rol, hoewel zeker geen volledige remming optrad. Een andere verklaring zou een interactie tussen detergent, benzine, water en grond kunnen zijn, hetgeen de beschikbaarheid voor afbraak zou verminderen.

De vraag over de microbiële activiteit van de bodem is onderzocht door de afbraak van enkele goed afbreekbare verbindingen te toetsen en door de afbraak in bodems van verschillende oorsprong te toetsen. Figuur 10 (O₂-M test) geeft het resultaat van de afbraak van natriumacetaat in Asten en TNO grond, waarbij ook het vochtgehalte gevarieerd is. Duidelijk was de hogere activiteit van de TNO grond. Nadat aan de op deze wijze ingezette grond benzine was toegevoegd, werd het resultaat van figuur 11 (O₂-M test) verkregen.

Daarnaast is met entmateriaal van diverse oorsprong de afbraak van benzine in waterige oplossingen onderzocht. In dit experiment (figuur 12 - CO₂-I test) gaf Asten grond geen enkele afbraak te zien.

Na bestudering van alle resultaten, met als opvallende punten de zeer lage activiteit van de Asten grond en het feit van een in de tijd

afnemende activiteit van de Asten grond (figuur 14), werd geconcludeerd dat de activiteit van de microbiële biomassa in de Asten grond als gevolg van de invriesprocedure na monsternamen (om verdamping van de benzinecomponenten tegen te gaan en om alle experimenten met dezelfde batch grond te kunnen uitvoeren) vrijwel volledig was vernietigd. Na toevoegen van het niet specifieke substraat natriumacetaat (figuur 10) werd weer enige biomassa gevormd die tot afbraak van benzine in staat was (figuur 11).

Besloten werd in het vervolg alleen nog experimenten uit te voeren met vers verzameld materiaal dat ter overbrugging gedurende slechts enkele dagen gekoeld (4 °C) mocht worden bewaard. Figuur 13 (CO₂-I test) toont dat koel bewaren gedurende een langere periode ook aanleiding gaf tot enige verlaging van de activiteit.

De figuren 8, 9, 16 (CO₂-T testen) en 15 (O₂-M test) tonen de afbraak van natriumacetaat en detergenten (Brij 35, Tween, betaine), waarbij na 6-7 weken sprake was van afbraakpercentages van 15-60 % en afbraaksnelheden van 4-20 mg C.kg⁻¹.d⁻¹ na initiële snelheden van 5-70 mg C.kg⁻¹.d⁻¹. Met name bij de afbraak van natriumacetaat en het detergent betaine leek sprake te zijn van een exponentiële afbraak.

In de figuren 17 en 18 (CO₂-I testen) is de Asten grond vergeleken met andere bodemonsters ten aanzien van de afbraak van benzine en een tweetal andere olieproducten: diesel en gasolie. Alle resultaten wezen op de veel lagere afbraakniveaus en -snelheden in de grond uit Asten ten opzichte van grond van andere locaties.

De microbiële populatie in de Asten grond bleek minder actief dan die in de andere onderzochte gronden, maar niettemin was de populatie in staat tot afbraak van benzine en andere organische stoffen.

De vraag of de beschikbaarheid van de benzine positief beïnvloed zou kunnen worden is onderzocht door het toevoegen van detergenten. De eis om met afbreekbare detergenten te werken maskeerde een eventuele benzine afbraak. Figuur 9 toont dat in aanwezigheid van benzine sprake was van een verminderde kooldioxideproductie, waarschijnlijk als gevolg van een verminderde afbraak van de detergent.

In de volgende fase van het onderzoek is op basis van de verzamelde resultaten niet systematisch verder gezocht naar de stimulering per parameter, maar naar de eventuele afbraakbeperkende factor. Naast de reeds bekende effecten van vochtgehalte, buffering en toevoegen van entmateriaal is onderzoek gedaan naar limitatie door fosfaat en zuurstof. In eerder onderzoek was al de mogelijke stagnering van de afbraak bij lage P doseringen aangetoond. Daarom zijn hogere P doseringen toegepast. Om te onderzoeken of in de aerobe proeven mogelijk toch als gevolg van diffusiebeperkingen een zuurstoflimitatie was opgetreden, is in diverse vormen geprobeerd een eventuele limitatie op te heffen.

De figuren 19 en 20 geven de resultaten van de CO₂-I test en de figuren 21 t/m 26 van de CO₂-T test. In de figuren 19 t/m 22 is ondermeer het resultaat weergegeven van de hogere fosfaats doseringen. Lagere C-P verhoudingen en dus hogere fosfaats doseringen leidden tot duidelijk verbeterde afbraakresultaten.

Onderzoek naar de limitatie door zuurstof (figuren 19 en 20), door vergelijking van schuddend, stilstaand en extra roerend incuberen, toonden aan dat hiervan binnen de opzet van dit batchonderzoek geen sprake was. Toevoegen van extra nitraat als electronenacceptor gaf ook

geen stimulering van de afbraak.

De resultaten in figuren 19 en 20 gaven allerlei mogelijkheden aan voor de stimulering van de afbraak die eerder gevonden resultaten bevestigden. Enten met een actieve olie-afbrekende populatie (KONI grond) gaf de beste resultaten. Verder stimuleerden vocht, nutriënten en buffering tot neutrale pH de afbraak, waarbij fosfaat een belangrijke rol speelde. Temperatuurverlaging naar 12 °C gaf slechts een geringe afname van de afbraak.

In de figuren 23 t/m 26 (CO₂-T test) zijn de resultaten gegeven van een iets anders opgezet onderzoek. Om verdamping te voorkomen tijdens het homogeniseren van de grondmonsters, is elke testserie met de te onderzoeken factoren ingezet met één bepaald grondmonster. Tussen de testseries was daarom sprake van concentratieverschillen, die interpretatie van de resultaten bemoeilijkten. Ook de interpretatie van de effecten werd moeilijker. De effecten van extra natriumacetaatdosering, toevoegen entmateriaal (kweek FINA grond) en extra fosfaatdosering waren niet eenduidig. Wel eenduidige resultaten waren: de zeer lage afbraak in aanwezigheid van hoge nitraatconcentraties, zowel onder aerobe als anaerobe omstandigheden, de lagere afbraak in geval van een kunstmatige ten opzichte van een historische verontreiniging en de lage afbraak als N en P niet werden toegevoegd. Uit de resultaten viel een trend op te maken dat bij de hoogste concentraties aan benzine de laagste afbraak gemeten werd en omgekeerd bij de laagste concentraties de hoogste afbraak. Mogelijk speelde bij deze hoge concentraties (12000 mg.kg⁻¹), die niet eerder getoetst waren, de remming van de microbiële populatie een rol.

In voortgezet onderzoek (figuur 27) met de CO₂-I test zijn naast het effect van verschillende doseringen van fosfaat met name de mogelijkheden voor alternatieve zuurstofbronnen onderzocht. In tegenstelling tot eerdere resultaten kon geen significant verschil worden geconstateerd tussen de verschillende P doseringen van C-P 100-1 tot 100-100. Enige N-P dosering bleek wel stimulerend. Wat betreft nitraat als alternatieve zuurstofbron werden eerdere waarnemingen bevestigd dat nitraat de afbraak juist remde. Het toevoegen van waterstofperoxide, maar in de aanwezigheid van KONI grond als extra ent, leek geen toxisch effect te hebben en bij hogere concentraties waterstofperoxide werd een hogere afbraak waargenomen.

Als vervolg op dit onderzoek zijn met de CO₂-I test nogmaals de effecten van fosfaats dosering, waterstofperoxidadosering en natriumacetaat toevoeging onderzocht (figuren 28 t/m 30). Naast toevoegingen op dag 0 zijn ook uitgestelde (H₂O₂) en vòorafgaande (natriumacetaat) doseringen toegepast. Latere dosering van waterstofperoxide om een direct toxisch effect te vermijden en eerdere dosering van natriumacetaat om initieel een hogere biomassa te hebben. De resultaten van de fosfaats dosering (figuur 28) kwamen overeen met die van eerdere proeven. Fosfaats doseringen van meer dan 10 % ten opzichte van de hier aanwezige benzine(koolstof) waren minimaal nodig om na adsorptie aan de grond vrij fosfaat beschikbaar te hebben. Boven deze minimale concentratie maakte het weinig verschil. De H₂O₂ toevoegingen (figuur 29) gaven aanleiding tot dezelfde afbraaksnelheden en -niveaus als die zonder toevoeging. Alleen bij een H₂O₂-dosering van 200 mg.kg⁻¹ op dag 0 was sprake van een toxisch effect. Bij toevoegen één week na incubatie was hier verder geen sprake van. Belangrijk in deze proeven was het ontbreken van een

remmend effect, terwijl op deze wijze een grote zuurstofreserve kon worden toegevoerd. Het toevoegen van natriumacetaat (figuur 30) had geen effect, tenzij het vooraf werd toegevoegd. Bij een voorafgaande dosering trad een hogere initiële afbraaksnelheid (gecorrigeerd voor de natriumacetaat afbraak) op, veroorzaakt door een hogere initiële biomassa. Uiteindelijk werden echter dezelfde afbraakniveaus bereikt.

Uit enkele niet systematisch genomen monsters was al meermalen geconstateerd dat de afbraak na enige tijd niet alleen een plateau bereikte, maar dat op dat moment nog maar weinig benzinecomponenten in water en grond aanwezig waren. In een tweetal onderzoeken (CO₂-T toets, figuren 23 t/m 26 en CO₂-I toets, geen figuur) is geprobeerd massabalansen op te stellen (tabel 2). Hieruit kwam naar voren dat inderdaad de gehalten in grond en water, in geval van een plateau in de afbraak, zeer laag waren en tevens dat in de C balans een groot gat zat. De recovery varieerde van 3 tot 43 %. Uit de metingen van de cumulatieve kooldioxideproductie ten opzichte van de beginconcentraties benzine volgden afbraakpercentages die varieerden van 0 tot 120 %, met gemiddelden van 2 tot 80 % (figuren 31B en 32B). Dit betekende dat de recovery's niet altijd laag behoeften te zijn.

3.2 Discussie.

3.2.1 Invloed van stikstof en fosfaat in concentratie en vorm.

Onderzoek in waterverzadigde en onverzadigde grond heeft aangetoond dat vooral fosfaat een belangrijke rol speelde. Verhoging van de C-P verhouding van geen fosfaat naar 100-20 leidde tot een hogere afbraaksnelheid en een hoger afbraakniveau. De binding van fosfaat aan de grond maakte dat bij C-P verhoudingen tot 100-1 vrijwel geen fosfaat vrij beschikbaar was. De C-N verhouding beïnvloedde de resultaten nauwelijks. Evenmin beïnvloedde de vorm van de stikstofbron de resultaten eenduidig significant, hoewel NH_4Cl iets minder geschikt leek. De autochtone stikstof in de grond alleen was onvoldoende voor de afbraak; enige stikstofdosering was noodzakelijk. De minimaal benodigde stikstof- en fosfaatosering kan worden afgeleid uit de nog uit te voeren kolomproeven. Van belang is de vraag of ammonium genitrificeerd wordt in de grond omdat hierbij ook zuurstof wordt geconsumeerd.

3.2.2 Invloed van het toevoegen van olie-afbrekende micro-organismen.

Het toevoegen van actieve olie-afbrekers in de vorm van KONI grond leidde tot de beste afbraakresultaten. De afbraak werd een factor 5 tot 12 gestimuleerd; afbraak in de vorm van kooldioxideproductie werd waargenomen tot zo'n 50 % van de aanwezige beginconcentraties benzine. Enten met voorgeïncubeerde Asten grondsuspensies of uit FINA grond opgekweekte benzine afbrekende populaties leidde niet tot een verhoging van de afbraaksnelheid. Asten grond en FINA grond hadden in

vergelijking met de KONI grond een lage olie-afbrekende activiteit hetgeen het verschil in stimulans bij toevoegen als entmateriaal verklaarde.

De literatuur biedt weinig aanknopingspunten ten aanzien van de praktische toepassing van het toevoegen van micro-organismen aan de grond. Bossert en Bartha (1984) beschreven de resultaten van diverse onderzoeken naar microbiële enting als inconsistent en vaak negatief. Gerba en Bitton (1984), Hagedorn (1984) en Gerba (1984) meldden in reviews transportafstanden van micro-organismen tot enkele tientallen centimeters in de onverzadigde zone, maar afstanden tot honderden meters in de verzadigde zone. Tijdens dit transport vindt retentie van de organismen plaats door filtratie en adsorptie, met als gevolg afnemende concentraties tijdens het transport. Allerlei factoren beïnvloeden de retentie en met name de wijze van toevoer van de micro-organismen is belangrijk. Gezien de retentie en transportrecovery is de praktische toepassing van entmateriaal mogelijk met te veel vraagtekens omgeven.

3.2.3 Invloed van pH, vochtgehalte en temperatuur.

Het bufferen van de zure Asten grond ($\text{pH-H}_2\text{O}$ 4.5-5.0) tot een neutrale pH (7.0-7.5) leverde in het algemeen een licht tot matig positief stimulerend effect op. Buffering is in de praktijk simpel te bereiken door een juiste verhouding te nemen van fosfaten die de afbraak toch al sterk beïnvloeden.

Vergelijking van de afbraak in waterverzadigde en onverzadigde grond toonde eenduidig aan dat verzadiging tot een verhoogde afbraak leidde.

Water is noodzakelijk als contactvloeistof (intermediair) tussen

micro-organismen en substraten. Nadeel van waterverzadiging is dat in totaal minder zuurstof beschikbaar is dan wanneer ook een gasfase aanwezig is.

De temperatuur is als beïnvloedende factor nauwelijks onderzocht. Verlaging van de temperatuur van 20 naar 12 °C gaf een 10 % lagere afbraak. Bossert en Bartha (1984) meldden in een review dat de optimale temperaturen meestal tussen 20 en 40 °C lagen en dat daarbij sprake was van zogenaamde Q_{10} waarden van ongeveer 2 (hetgeen een snelheidstoename van een factor 2 bij 10 °C temperatuurstijging betekent). Hierbij werd wel aangetekend dat dit alles sterk afhankelijk is van de aard van de micro-organismen ter plaatse: psychrofiel en/of mesofiel. Bij temperaturen beneden 5 °C namen afbraak en biomassavorming sterk af en in geval van bevroren bodemvocht stopte het afbraakproces.

3.2.4 Limitatie in de zuurstofbeschikbaarheid.

Onder de toegepaste proefomstandigheden (dus in de aanwezigheid van een zuurstofreservoir in de vorm van lucht boven de vloeistof) was zuurstof niet beperkend voor de afbraak. Niettemin is het in de praktijk zeer wel mogelijk dat een zuurstoflimitatie ontstaat omdat dan vrijwel geen gasfase aanwezig is. Als alternatieven zijn daarom nitraat en waterstofperoxide onderzocht. Toepassing van zuivere zuurstof is ook een alternatief, maar hoeft als zodanig niet in deze proefopzet met voldoende luchtzuurstof onderzocht te worden. Toevoegen van nitraat leidde in ieder geval niet tot betere afbraakresultaten en in geval van de afwezigheid van zuurstof was de afbraak veel minder. In een aantal experimenten werd een verlaagde afbraak na toevoegen van extra nitraat

gevonden. Voor zover analyses beschikbaar waren, was dit geen gevolg van nitriettoxiciteit (concentraties $< 0.1 \text{ mg.l}^{-1}$). Het toevoegen van waterstofperoxide gaf geen aanleiding tot veranderingen in afbraaksnelheid of -niveau. In feite was er nog geen noodzaak voor het gebruik van waterstofperoxide als zuurstofdonor, dus geen reden om een hogere afbraak te verwachten. Belangrijk was wel de constatering dat bij concentraties waterstofperoxide tot 100 mg.kg^{-1} geen remmend effect optrad, zodat op deze wijze veel extra zuurstof in de grond kan worden gebracht.

3.2.5 Invloed van de aanwezigheid van detergenten.

De detergenten (bètaïne en Brij 35) werden snel afgebroken in schone grond, maar in verontreinigde grond, in aanwezigheid van benzine, werd een vertraagde afbraak waargenomen. De toepassing van afbreekbare detergenten leidde niet tot een verbetering van de afbraakresultaten. Daarentegen consumeerden ze wel een deel van de beschikbare zuurstof. Tevens was het op grond van de testresultaten zeer waarschijnlijk dat in competitie eerst het detergent en dan pas de benzinecomponenten werden afgebroken, hetgeen het ontbreken van een stimulerend effect zou verklaren. Toepassing van afbreekbare detergenten lijkt daarom ongewenst en ter discussie kan staan of mogelijk toch persistente(re) alternatieven moeten worden onderzocht.

3.2.6 Activiteit van de biomassa.

De Asten grond bleek in vergelijking met enkele andere gronden een lage

microbiële activiteit te bezitten, waarschijnlijk als gevolg van het lage organische koolstof gehalte van de grond, dat slechts een kleine populatie in stand kan houden. Dit ondanks het feit dat al enkele jaren benzine beschikbaar is als substraat. Hoewel de populatie in staat was natriumacetaat exponentieel af te breken is dit nimmer waargenomen voor de afbraak van benzine.

Van een toxisch effect van de benzinecomponenten of afbraakproducten leek nauwelijks of geen sprake te zijn. De loodgehalten die bepaald zijn in de grond (Verheul e.a. 1987), lagen beneden de A-waarden en toxische effecten van lood werden daarom niet verwacht.

Bij de toepassing van natriumacetaat om een verhoogde biomassa te krijgen, werd soms een (initieel) verhoogde afbraak geconstateerd. Toepassing van natriumacetaat in de praktijk leidt overigens tot een verhoogd verbruik van de schaarse zuurstof.

3.2.7 Afbraaksnelheid en massabalans.

In de figuren 31 en 32 is een samenvatting gegeven van alle testresultaten voor de verschillende testparameters en testseries. Naast de in de test gemeten maximale afbraaksnelheid (A), gebaseerd op kooldioxideproductie of zuurstofverbruik, is het percentage omgezette koolstof ten opzichte van de beginconcentratie benzine (B) gegeven. Uit deze gegevens kunnen de afbraaksnelheden voor een drietal karakteristieke situaties afgeleid worden. De natuurlijke afbraaksnelheid, onder de op de locatie heersende omstandigheden, met de verontreiniging in de onverzadigde zone, werd vanuit de laboratoriumexperimenten op $1-2 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ geschat. Onder verzadigde

omstandigheden, dus in geval van percoleren, werd een afbraaksnelheid van 3-4 mg C.kg⁻¹.d⁻¹ gemeten. Onder de in de laboratoriumexperimenten meest optimale omstandigheden (inclusief waterverzadiging, dus percoleren) vastgestelde afbraaksnelheid was gemiddeld 10 mg C.kg⁻¹.d⁻¹, met een range van 5 tot 40 mg C.kg⁻¹.d⁻¹.

Bossert en Bartha (1984) rapporteerden in hun review van literatuurgegevens over afbraak van olieproducten in grond, afbraaksnelheden die varieerden van 20 tot 1380 mg olie.kg⁻¹.d⁻¹, maar van 20 tot 100 mg C.kg⁻¹.d⁻¹ onder de in de Nederlandse bodem heersende temperaturen. Aangezien in geval van kooldioxideproductie-meting een evenredig grote opname van koolstof in celmateriaal werd meegerekend, resulteerden kooldioxideproductiesnelheden van 10 tot 50 mg C.kg⁻¹.d⁻¹, overeenkomstig de in dit onderzoek gemeten waarden.

In hoeverre de gegeven afbraaksnelheden direct toepasbaar zijn op de afbraak in de veldsituatie, zal vanuit de uitvoering van de kolomproeven verder bevestigd moeten worden. Het is duidelijk dat in de laboratoriumproeven zowel positieve (schuddend incuberen van een slurry met een intensief contact) als negatieve (vervluchtiging van de benzinecomponenten) punten meespeelden.

Uit incidentele gegevens en een enkel gericht onderzoek is komen vast te staan dat bij het bereiken van de constante afbraakniveaus de concentraties aan benzinecomponenten in water en grond tot vrijwel nul gereduceerd waren (tabel 2). Aangezien de afbraakpercentages op basis van zuurstofopname of kooldioxideproductie in deze proeven varieerden van 0 tot 40 % (tabel 2) en de gemiddelde afbraakpercentages over alle proeven van 2 tot 80 % (figuren 31B en 32B), bestond een groot gat in de koolstofbalans. Dit was waarschijnlijk een gevolg van de vervluchtiging

van de benzinecomponenten. Het systeem water-grond slurry, zoals gebruikt in de CO₂-T test vergemakkelijkte de vervluchtiging door een intensief water-grond contact.

De beschikbaarheid voor de afbraak zal daarom afhankelijk zijn van:

- de oplosbaarheid en oplossnelheid van de componenten;
- de mate en snelheid van vervluchtiging;
- de diffusiesnelheid van gasfase naar waterfase.

Daarnaast werd in de CO₂-T test, in tegenstelling tot de CO₂-I test en de O₂-M test, de testfles noodzakelijkerwijs regelmatig geopend en dus verversing van de gasfase met verlies van de vluchtige componenten mogelijk gemaakt.

In alle proeven werd een vrijwel lineaire afbraak waargenomen. Dit duidde erop dat of de limiterende factor nog niet was onderkend of dat de stofoverdracht in de vorm van het beschikbaar komen van de benzinecomponenten de afbraaksnelheid bepaalde. Het is waarschijnlijk dat geen netto groei van de biomassa plaatsvond, hetgeen ook zou verklaren waarom de C-N en C-P verhoudingen (boven een bepaalde limietwaarde) geen rol van betekenis speelden. Bij een hoge initiële biomassa (KONI, natriumacetaat toevoeging) werd een hoge afbraaksnelheid waargenomen die later tot hetzelfde niveau terugviel als wanneer alleen de autochtone biomassa aanwezig was. Uiteindelijk werd dan toch een hoger afbraakpercentage bereikt (afbraak vóór vervluchtiging). Aangezien in de kolomproeven en de veldsituatie vervluchtiging een veel kleinere of zelfs geen kans krijgt, zal in deze systemen de beschikbaarheid door externe factoren beïnvloed moeten worden.

3.3 Conclusies.

De afbraaksnelheid van de benzineverontreiniging in de Asten grond werd voornamelijk bepaald door de snelheid waarmee de benzinecomponenten beschikbaar kwamen. De beschikbaarheid is een functie van de wateroplossnelheid en de vervluchtiging van de verschillende benzinecomponenten. In de grond was sprake van een lage microbiële activiteit welke niet toenam tijdens de afbraak. De resultaten wezen op het uitblijven van een netto groei van de populatie. Als te beïnvloeden parameters resteren de activiteit van de biomassa en de beschikbaarheid van de benzineverontreiniging.

De vergelijkbaarheid van de resultaten werd sterk beïnvloed door het feit dat de meeste factoren steeds in kleine proefopzetten met grond met wisselende biologische activiteit en/of variërende benzineconcentraties, zijn onderzocht. Door de genoemde variaties zijn de resultaten, zoals samengevat in de figuren 31 en 32, niet direct vergelijkbaar ten aanzien van de effecten. Maar uit de analyse per toetsreeks en door onderlinge vergelijking konden de conclusies getrokken worden.

De aanwezigheid van voldoende vocht en een neutrale pH (door een juiste keuze van een fosfaatbuffer) droegen bij aan een optimale afbraaksnelheid. N en P dosering was noodzakelijk. Vanwege de binding van fosfaat aan de grond was in deze proefopzet een C-N-P dosering van 100-10-10 noodzakelijk. In geval van percolatie van de grond moet in het begin een overmaat aan fosfaat gedoseerd worden, maar na doorbreken van fosfaat en stikstof kan de dosering vastgesteld worden op basis van het verbruik in de grond. Als N bron leken NH_4NO_3 of KNO_3 het meest

geschikt. Als alternatieve zuurstofbron bood waterstofperoxide perspectief. Tot concentraties van 100 mg H_2O_2 /kg was geen sprake van een toxisch effect. Het toevoegen van extra nitraat leidde niet tot een verhoging, maar in enkele gevallen tot een vertraging van de afbraak, echter niet als gevolg van nitriettoxiciteit. Activering van de biomassa door toevoegen van entmateriaal gaf de beste resultaten, maar lijkt praktisch - gezien de retentie van micro-organismen in de grond - niet haalbaar. Stimulering vond ook plaats door toevoegen van natriumacetaat. Detergenten toegepast om de beschikbaarheid van benzine te verhogen, stimuleerden de afbraak niet.

De natuurlijke afbraaksnelheid onder de op de locatie heersende omstandigheden, met de verontreiniging in de onverzadigde zone, werd geschat op als op 1-2 mg C.kg⁻¹.d⁻¹. De afbraak kon versneld worden door deze in een waterverzadigd systeem te laten plaatsvinden door percoleren van de grond. Onder verzadigde omstandigheden werd een afbraaksnelheid van maximaal 3-4 mg C.kg⁻¹.d⁻¹ gemeten. De onder de meest optimaal gestimuleerde omstandigheden (inclusief percolatie) vastgestelde afbraaksnelheid was 10 mg C.kg⁻¹.d⁻¹ met een range van 5 tot 40 mg C.kg⁻¹.d⁻¹. De bijbehorende afbraakpercentages varieerden van 10 tot 40 %.

4 Uitloogexperimenten.

4.1 Resultaten van de uitloogproeven.

De uitspoeling van benzinecomponenten uit een continu doorstroomde kolom is voornamelijk onderzocht voor bodemmateriaal waaraan een 'verse' verontreiniging was toegevoegd. Alleen in een tweede serie experimenten is ook een historisch verontreinigde grond meegenomen. In de eerste serie experimenten is de invloed van het percolatiedebiet, de benzine concentratie en de aanwezigheid van niet-persistente detergenten in het influent op de uitspoeling onderzocht. De tweede serie was gericht op het effect van fosfaatdoseringen op de uitspoeling.

4.1.1 Invloed van het percolatiedebiet en de benzineconcentratie.

De uitspoeling van de benzinecomponenten, gemeten als cumulatief uitgespoelde organische koolstof in een kolom 'vers' met benzine verontreinigde grond ten opzichte van een kolom schone grond (blanko), is onderzocht als functie van het percolatiedebiet door de kolom en als functie van de concentratie van de benzineverontreiniging.

Figuur 33 toont als voorbeeld de concentratie uitgespoelde organische koolstof als functie van de tijd voor een tweetal percolatiedebieten. Na een hoge uitspoeling in de beginfase (5 dagen) met concentraties tot 200 mg C.l^{-1} vond verdere uitspoeling plaats met in de tijd langzaam afnemende gehalten op een niveau van $10\text{-}20 \text{ mg C.l}^{-1}$. De snelheid van uitspoeling na de beginfase was afhankelijk van het percolatiedebiet en bedroeg maximaal $5 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. De figuren 34 en 35 geven de

cumulatief uitgespoelde organische koolstof weer als functie van de tijd. Een hoger debiet resulteerde in meer uitgespoelde benzine. De concentratie van de verontreiniging had geen invloed op de hoeveelheid uitgespoelde benzine onder de hier gebruikte testcondities en bij deze concentraties. Hoewel het aantal proeven beperkt is gebleven, leek het niet onwaarschijnlijk dat de cumulatief uitgespoelde benzine recht evenredig was met het debiet (figuur 36). Bij het maximaal mogelijke debiet van 9 ml.h^{-1} was na ongeveer 3 weken 140 mg C uitgespoeld, hetgeen bij de hoogste concentratie van de verontreiniging (15 %) overeenkwam met slechts 8 % uitspoeling. De resultaten van zowel de gehalten in het effluent als de daaruit berekende cumulatieve uitspoeling van de benzine wezen op een afname in de tijd van de uitspoeling.

4.1.2 Invloed van detergenten.

Om de mogelijkheid te onderzoeken of detergenten door hun oppervlakte actieve werking de beschikbaarheid - mobiliteit - van benzine zou verhogen zijn uitloogproeven uitgevoerd, waarbij aan de doorstromende nutriëntenoplossing een detergent werd toegevoegd. Omdat een detergent ook zelf bijdraagt aan de uitspoelende organische koolstof werd de uitspoeling gerefereerd aan kolomproeven zonder benzineverontreiniging. Het bleek dat het toevoegen van een detergent aan een met benzine verontreinigde kolom tot een in de tijd afnemend debiet leidde (figuur 37). Blijkbaar raakte de kolom verstopt. Voor het detergent SLS nam het debiet ook af als geen verontreiniging aanwezig was en bij de toepassing van Decon, lecithine en betaine (geen figuur) was sprake van

zeer lage doorstroomsnelheden en een snelle verstopping.

Figuur 38 geeft als functie van de percolatietijd de cumulatief uitgespoelde organische koolstof weer voor verschillende detergenten ten opzichte van een kolom waarin geen benzine was aangebracht. Een negatief verschil in de uitspoeling betekende in dit geval dat cumulatief meer organische stof uit de niet verontreinigde kolom was gespoeld dan uit de met benzine verontreinigde kolom. Duidelijk wordt hieruit dat het toevoegen van een detergent zeker geen positief effect opleverde, maar een negatieve werking had.

4.1.3 Invloed van fosfaat en de historische verontreiniging.

In de afbraakexperimenten werd een niet direct verklaarbare stimulering van de afbraak bij hogere fosfaatconcentraties geconstateerd. In de tweede serie uitloogexperimenten werd onderzocht of een verhoogde mobiliteit van de benzinecomponenten onder invloed van fosfaat een verklaring kon zijn. Ter vergelijking van een kunstmatig en een historisch verontreinigde grond werd in de tweede serie ook een historisch verontreinigde grond meegenomen.

De tweede serie experimenten heeft niet direct bruikbare resultaten opgeleverd. Om de poriën van de schone grond zich te laten vullen met benzine werd een hoeveelheid opgebracht ruim boven de restverzadiging. Maar vervolgens spoelde niet, zoals verwacht, vrij product uit in alle benzine verzadigde kolommen, maar in slechts 3 van de 5. Ook de totale hoeveelheid uitgespoelde vrij product was gering ten opzichte van wat verwacht mocht worden. Ook na de eerste fase bleven de resultaten moeilijk te interpreteren; de voor een concentratie ingezette duplo's

weken sterk van elkaar af. Voor zover interpretatie mogelijk was, leek fosfaat de uitspoeling niet te bevorderen, maar in tegenstelling juist te belemmeren.

Figuur 39 toont het resultaat van de percolatie door de kolom met de historisch verontreinigde grond: de cumulatief uitgespoelde hoeveelheid benzine, omgerekend op koolstofbasis, als functie van de tijd.

4.1.4 Massabalans.

Bij het opmaken van de massabalansen (tabel 3) bleek dat in de 2e serie experimenten de recovery's voor de benzine verzadigde kolommen zeer laag (0.1 - 4.5 %) waren. De recovery voor de historisch verontreinigde grond (46 %) was relatief hoog, evenals die van de eerste serie experimenten (66 - 82 %). In deze laatste gevallen was steeds sprake van hoge concentraties in de grond na doorspoelen, in tegenstelling tot de experimenten met lage recovery's (tabel 3).

4.2 Discussie.

Het onderzoek heeft aangetoond dat bij deze wijze van aanpak de uitspoeling van benzinecomponenten, die als restverzadiging in de grond voorkomen, gering was en niet werd beïnvloed door de concentratie van de verontreiniging. Een lineaire relatie werd afgeleid tussen de totale hoeveelheid uitgespoelde organische koolstof en het percolatiedebiet. Dit alles wees erop dat sprake was van een vrijwel momentane evenwichtsinstelling ten aanzien van de verdeling van de benzinecomponenten naar de waterfase. Van der Waarden e.a. (1971) hebben dit geconstateerd voor de doorstroming van een restverzadiging met minerale olie in een kolom gevuld met glasparels.

Uit het uitgevoerde onderzoek volgde dat in de beginfase zeer hoge concentraties aan benzinecomponenten uitspoelden in het percolaat, waarschijnlijk als gevolg van het geforceerd uitdrijven van het bodemvocht, waarin de opgeloste benzinecomponenten al lange tijd in evenwicht waren met die aan/in de vaste fase. Na ongeveer 5 dagen nam de concentratie af van 100-200 mg C.l⁻¹ naar 10-20 mg C.l⁻¹ (figuur 33). Dit heeft mogelijk tot gevolg voor de sanering dat initieel hoge concentraties benzinecomponenten uitspoelen en het effluent eventueel zou moeten worden behandeld. Verdere informatie hierover moet bij de uitvoering van kolomexperimenten verzameld worden. Na de eerste fase van 5 dagen werd een uitspoelingssnelheid van maximaal 5 mg C.kg⁻¹.d⁻¹ gemeten. Tijdens de duur van de proef werd een afname in de cumulatieve uitspoeling waargenomen, mogelijk als gevolg van het overblijven van steeds slechter wateroplosbare componenten. Maar hoe de uitspoeling op langere termijn zal zijn, was niet uit de verkregen resultaten af te

leiden.

Er zijn aanwijzingen dat een verontreiniging die al enige tijd in contact is geweest met de grond een andere beschikbaarheid heeft dan wanneer deze vers wordt aangebracht. Dit heeft waarschijnlijk met de vorming van bindingen en het doordringen in meso- en microporiën te maken. Het gevolg is dat bij onderzoek de verontreinigde grond als testmateriaal gebruikt moet worden. Anders dienen eventuele bevindingen met verse verontreinigingen geverifieerd te worden aan onderzoek met een historische verontreiniging. Dit geldt met name voor hydrofobe verbindingen en is onder meer afhankelijk van het organisch stofgehalte van de bodem.

In het enige uitloogexperiment dat uitgevoerd werd met een historisch verontreinigde grond, werd een bevestiging van het bovenstaande gevonden. Deze conclusie dient wel met de nodige voorzichtigheid gehanteerd te worden vanwege het eenmalige karakter en de verschillen in uitvoering van de series experimenten. De percolatie door de historisch verontreinigde grond toonde dat in vergelijking met de eerste serie experimenten de hoeveelheid uitgespoelde benzine (55 mg C) een factor 4 kleiner was dan verwacht zou worden op basis van de percolatiesnelheid. Opgemerkt moet worden dat de analytische basis verschillend was voor de twee series: 1e serie DOC, 2e serie DOC op basis van benzinecomponenten analyse (GC). De historisch verontreinigde grond leek inderdaad een verminderde uitspoeling te vertonen, maar als gevolg van een andere proefopzet blijft dit resultaat omgeven met vraagtekens.

De combinatie van de factoren historische verontreiniging en lange termijn uitspoeling van slecht wateroplosbare componenten maakt een

tragere uitspoelsnelheid dan $5 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ op termijn waarschijnlijk.

Uit de experimenten is gebleken dat de mobiliteit van de benzinecomponenten onder de toegepaste proefomstandigheden niet kon worden bevorderd door het toepassen van detergenten. De verstopping van de kolommen in geval van de toepassing van detergenten zou een gevolg kunnen zijn van de toename van de biomassa na groei op de goed afbreekbare detergenten. De tweede mogelijkheid was een verstopping als gevolg van een interactie tussen olie, water, detergent en vaste fase (Somers en Drok 1971). Deze tweede mogelijkheid leek het meest waarschijnlijk, omdat het verschijnsel in ieder geval altijd in benzine verontreinigde kolommen werd waargenomen, maar de vraag blijft of benzine in de interactie betrokken is, omdat ook in niet verontreinigde kolommen met sommige detergenten (SLS, lecithine, betaine en Decon) problemen optraden. Het is niet uitgesloten dat de oorzaak voor de verschillende detergenten anders is.

Omdat in de afbraakexperimenten een stimulering van de afbraak door hogere fosfaatconcentraties werd geconstateerd, werd een grotere mobiliteit van de benzinecomponenten onder invloed van fosfaat gesuggereerd. In de uitgevoerde experimenten kon geen bevestiging hiervan worden gevonden.

In de koolstofmassabalans van de eerste serie experimenten en van de historisch verontreinigde grond werden relatief hoge recovery's gevonden in vergelijking met de benzine verzadigde kolommen van de 2e serie (tabel 3). Bij de hoge recovery's was steeds sprake van hoge concentraties in de grond na beëindiging van de percolatie. Ten aanzien

van de uitgespoelde organische koolstof moet worden opgemerkt dat deze in de eerste serie experimenten gebaseerd werd op DOC analyse en dus meting van alle organische componenten, terwijl de uitspoeling in de tweede serie experimenten berekend is op basis van alleen de analyse van de benzinecomponenten. Dit kan een gedeeltelijke, maar - geen afdoende verklaring vormen voor de zeer lage recovery's.

4.3 Conclusies.

Gedurende het percoleren door een kolom met verontreinigde grond was sprake van een vrijwel momentane evenwichtsinstelling ten aanzien van de verdeling van de benzinecomponenten naar de waterfase. Kort na aanvang van de percolatie spoelden grote hoeveelheden benzinecomponenten uit. Deze uitspoeling is van belang met betrekking tot het aspect van mogelijk noodzakelijke zuivering van de opgepompte vloeistof vóór lozing of recirculatie kan plaatsvinden.

Na een hoge uitspoeling in de beginfase van percoleren, werd een uitspoeling bereikt van maximaal $5 \text{ mg C.kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Tijdens de beperkte duur van de proef was een afname van uitspoeling in de tijd waarneembaar, mogelijk als gevolg van verminderde uitspoeling van slecht wateroplosbare componenten.

Uit één experiment uitgevoerd met een historisch verontreinigde grond is de aanwijzing gekomen dat een verontreiniging die al enige tijd in contact was geweest met de grond, een verminderde beschikbaarheid had dan wanneer deze vers werd aangebracht.

De combinatie van de factoren historische verontreiniging en lange termijn uitspoeling van slecht wateroplosbare componenten maakt een tragere uitspoelsnelheid dan $5 \text{ mg C.kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ op termijn waarschijnlijk.

De mobiliteit van de benzinecomponenten kon niet worden bevorderd door het toepassen van detergents mede vanwege verstopping van de grond.

Verhoogde fosfaatconcentraties verhoogden niet de mobiliteit van benzinecomponenten in de grond. De stimulerende hogere fosfaats dosering was alleen noodzakelijk in verband met de binding van fosfaat aan de grond.

5 Eindconclusies en aanbevelingen.

De afbraaksnelheid van het natuurlijke, niet extern beïnvloede, reinigingsproces werd op 1-2 mg C.kg⁻¹.d⁻¹ geschat. Sanering door percolatie alleen leidde na een eerste geforceerde uitspoeling, tot eliminatiesnelheden in de eerste maand van maximaal 5 mg C.kg⁻¹.d⁻¹. Deze snelheid bleek langzaam af te nemen in de tijd. Door de beperkte duur van de proef en de factor historische verontreiniging is een voorspelling over de benodigde termijn voor volledige uitspoeling niet mogelijk. De afbraak onder waterverzadigde, maar verder niet beïnvloede omstandigheden, was 3-4 mg C.kg⁻¹.d⁻¹. De onder de meest optimaal gestimuleerde omstandigheden (inclusief percolatie) vastgestelde biologische afbraaksnelheid was gemiddeld 10 mg C.kg⁻¹.d⁻¹, met een range van 5-40 mg C.kg⁻¹.d⁻¹. Als deze afbraaksnelheid, vastgesteld onder optimale laboratorium omstandigheden direct als maat voor de snelheid in het veld zou mogen worden genomen, kan een saneringsduur door stimulering van de biologische afbraak van ongeveer 1.5 jaar berekend worden.

De resultaten van de afbraakproeven en de uitloogproeven wijzen erop dat alle inspanning bij de uitvoering van de kolomproeven en de praktijksanering gericht moet zijn op:

- a. de verhoging van de initiële biomassa in activiteit en/of massa;
- b. de verhoging van de beschikbaarheid van de benzinecomponenten.

Op basis van de resultaten van het laboratoriumonderzoek moesten keuzes gemaakt worden voor het opvolgende pilot plant schaal kolomonderzoek.

Dit kolomonderzoek wordt uitgevoerd om de gevonden resultaten (in doorstroomsystemen) te bevestigen en onderzoek te doen naar zuurstoflimitatie en eventuele alternatieve zuurstofbronnen.

De volgende opzet van de kolomexperimenten wordt voorgesteld. De kolom wordt volledig waterverzadigd door percoleren met een nutriëntenoplossing, waarvan de samenstelling bij de start gebaseerd zal zijn op een C-N-P verhouding van 100-10-10, later aan te passen aan de effluent gehalten, en een afbraaksnelheid van $10 \text{ mg C.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ met NH_4NO_3 als N bron en K_2HPO_4 en NaH_2PO_4 als P bron en met een geschikte samenstelling voor buffering op neutrale pH. Omdat het zuurstofverbruik de maximaal mogelijke zuurstoftoevoer zal overschrijden wordt onderzoek naar de alternatieve zuurstofbronnen nitraat en waterstofperoxide aanbevolen. Om de biomassa op een hoger niveau te brengen wordt aanbevolen in een van de kolommen natriumacetaat te doseren, maar zodanig dat dit niet tot een langdurig verhoogde zuurstofopname zal leiden.

Op basis van de resultaten van het kolomonderzoek zullen uiteindelijk de keuzes ten aanzien van de inrichting van de locatie voor de sanering (inclusief behandelingen) moeten worden gemaakt.

6 Gerefereerde literatuur en basismateriaal.

Bossert, I., and Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. Pp. 435-474 In: Petroleum microbiology. R.M. Atlas, Ed. Macmillan Publ. Comp., New York.

Eikelboom, D.H. 1985. In situ biorestauroatie van een met olieprodukten verontreinigde ondergrond. Een literatuurstudie. TNO rapport R85/320 (TNO Delft).

Flowers, T.H., Pulford, I.D., and Duncan, H.J. 1984. Studies on the breakdown of oil in soil. Environm. Poll. B8, 71-82.

Frijns, P. 1986. Fysische parameters bij de beschrijving van een restverzadiging benzine in zandgrond. Stageverslag RIVM.

Gerba, C.P. 1984. Microorganisms as groundwater tracers. Pp. 225-234 In: Groundwater pollution microbiology. G. Bitton and C.P. Gerba, Eds. John Wiley & Sons Inc., New York.

Gerba, C.P., and Bitton, G. 1984. Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater. Pp. 65-88 In: Groundwater pollution microbiology. G. Bitton and C.P. Gerba, Eds. John Wiley & Sons Inc., New York.

Hagedorn, C. 1984. Microbiological aspects of groundwater pollution due to septic tanks. Pp. 181-196 In: Groundwater pollution microbiology. G. Bitton and C.P. Gerba, Eds. John Wiley & Sons Inc., New York.

Kokkelink, I. 1986. Uitloging van olie in continue doorstroomde grondkolommen en de invloed hierop van detergenten. Stageverslag RIVM.

Rijsdorp, I. 1986. Onderzoek naar de omstandigheden voor afbraak van benzine door micro-organismen in de diepere ondergrond. Stageverslag RIVM.

Somers, J.A., en Drok, J. 1971. Bodemverontreiniging door olie. Mobilisering van immobiele olieresten in de bodem. IG-TNO rapport A59 (TNO Delft).

TNO. 1986-1987.... Resultaten van de laboratorium afbraak experimenten.

Verheul, J.H.A.M. 1986. In situ biorestauratie van een met olie verontreinigde bodem. Interimrapport no.1 (15.1.85 t/m 15.3.86). RIVM.

Verheul, J.H.A.M., Eikelboom, D.H., en Berg, R.van den. 1987. In situ biorestauratie van een met olie verontreinigde bodem. Nader onderzoek rapport. RIVM rapport 728518001 (RIVM Bilthoven).

Visser, M. 1987. De biorestauratie van een met olieprodukten verontreinigde bodem onder laboratoriumomstandigheden. Stageverslag RIVM.

Waarden, M. van der, Bridie, A.L.A.M. and Groenewoud, W.M. 1971.

Transport of mineral oil components to groundwater-I. model experiments on the transfer of hydrocarbons from a residual oil zone to trickling water. Water Res. 5, 213-226.

Tabel 1. Groepsindeling en bioafbreekbaarheid van enkele detergenten.

detergent	werkzame stof	groep	afbreekbaarheid in OECD screeningstest 1 afbraak na 28 d.
SLS	natriumlaurylsulfaat	anionisch	98
Brij 35	polyoxyethyleenlaurylether	non-ionisch	95
Decon 80		non-ionisch	86
Tween 80	polyoxyethyleensorbitanmonoleaat	non-ionisch	59
Betaïne	(carboxymethyl)trimethylammoniumhydroxide	amfolytisch	100
Lecithine	fosfatidylcholine uit sojabonen	fosfolipide	100

Tabel 2. Massebalans van enkele benzine afbraakexperimenten.

experiment nummer (code)	referentie figuur	benzine op t=0 als org.C (mg C)	duur van de proef (d)	<u>koolstofbalans aan het einde van de proef</u> <u>benzine als org.C. (mg C)</u>			recovery (%)
				in waterfase	in grond	in CO ₂ (mg C)	
I R 1-9	1, KNO ₃ , CNP var.	40	49	n.d. ³⁾	1.8-2.5	6.6-15.3	22-43
I R 11	1, KNO ₃ , CNP 500-50-1	80	42	n.d.	2.0	17.7	25
I R 15 ¹⁾	-, KNO ₃ , CNP 500-50-1	80	42	n.d.	2.2-2.9	3.6-6.9	8-12
MV R	23-26, div.	420-960	83	<1- 2 8-19 ⁴⁾	<1	3-141	3-35
I 10 ²⁾	12	430	35	<0.04	-	20	5
I 11 ²⁾	18	430	20	0.5	-	57	13
I 17	-, CNP 100-10-10	160	14	n.d.	5.0	15.2	12
		160	28	n.d.	2.5	19.4	13

1) experiment waarbij grond met 1% HgCl₂ gesteriliseerd werd.

2) afbraakexperiment in water.

3) n.d. = niet gemeten.

4) meting totaal opgelost organisch C als DOC.

Tabel 3. Massabalansen van enkele uitloogexperimenten.

serie nr. code	referentie figuur	debiet (ml/h)	fosfaat (mg/l)	totaal org.C ¹⁾ op t=0 (mg C)	org.C in vaste fase (mg C) ²⁾	uitgespoelde org.C (mg C) ²⁾	recovery (%)
serie 1 A ³⁾	33	2		1800	1440	30- 40 ⁴⁾	82
1 B ³⁾	33	9		1800	1060	120-130 ⁴⁾	66
serie 2 A ³⁾	-	6	0	12500	1-3	550	4.4
2 B ³⁾	-	6	10	12500	28	80	0.9
2 C ³⁾	-	6	100	12500	3	15	0.2
2 D ³⁾	-	6	1000	12500	1	530	4.2
2 E ³⁾	-	6	100	12500	44	445	3.9
2 D ³⁾	39	6	100	700 ⁵⁾	265	55	46

1) theoretisch toegevoegde benzine als org.C.

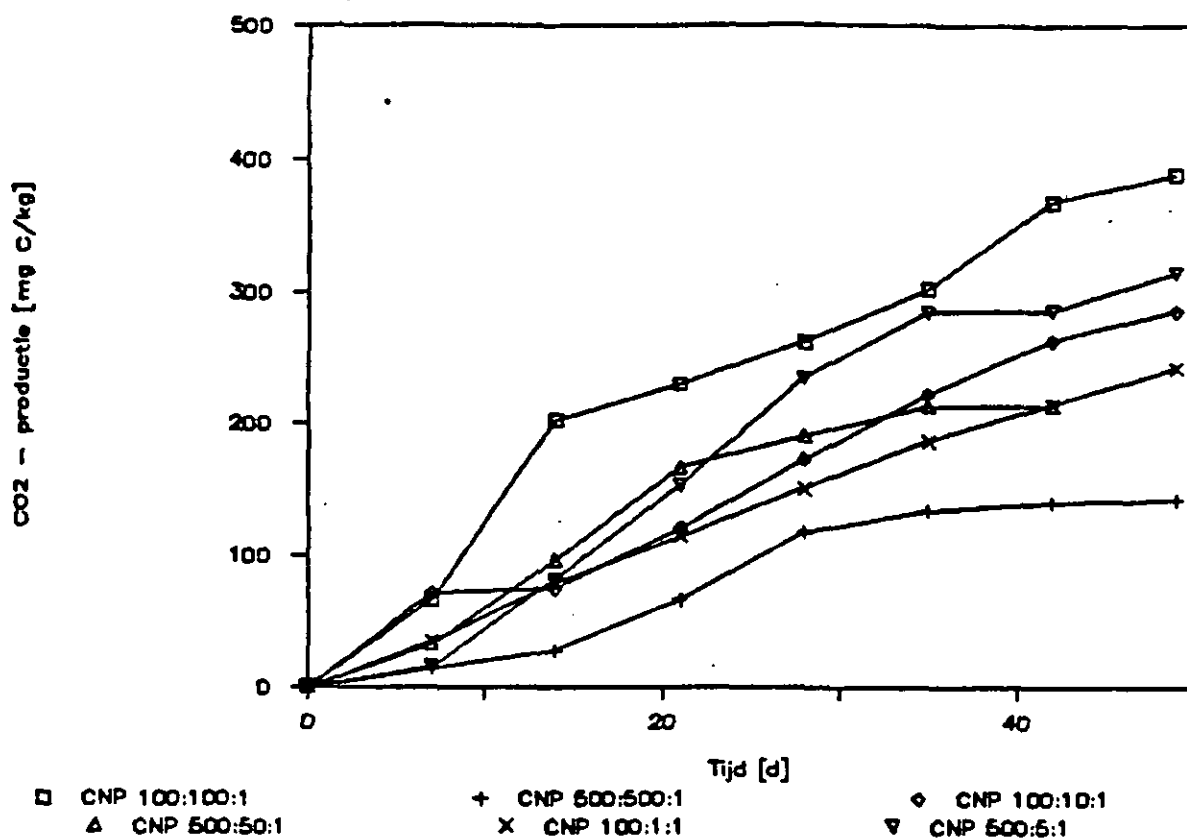
2) gemeten als specifieke benzinecomponenten.

3) duur van de experimenten; serie 1: 28 dagen, serie 2: 49 dagen.

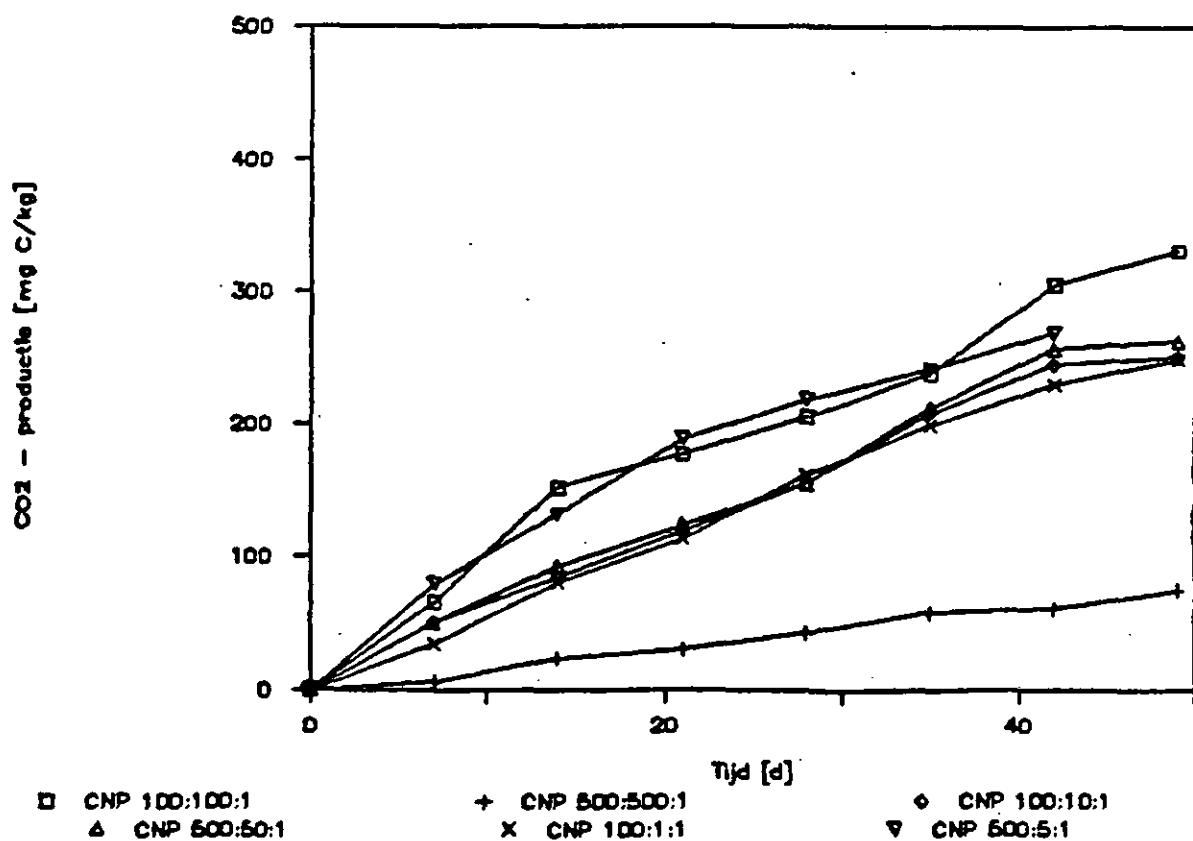
4) gemeten als opgeloste organische C.

5) in plaats van kunstmatig verontreinigde grond: historisch verontreinigde grond van de locatie.

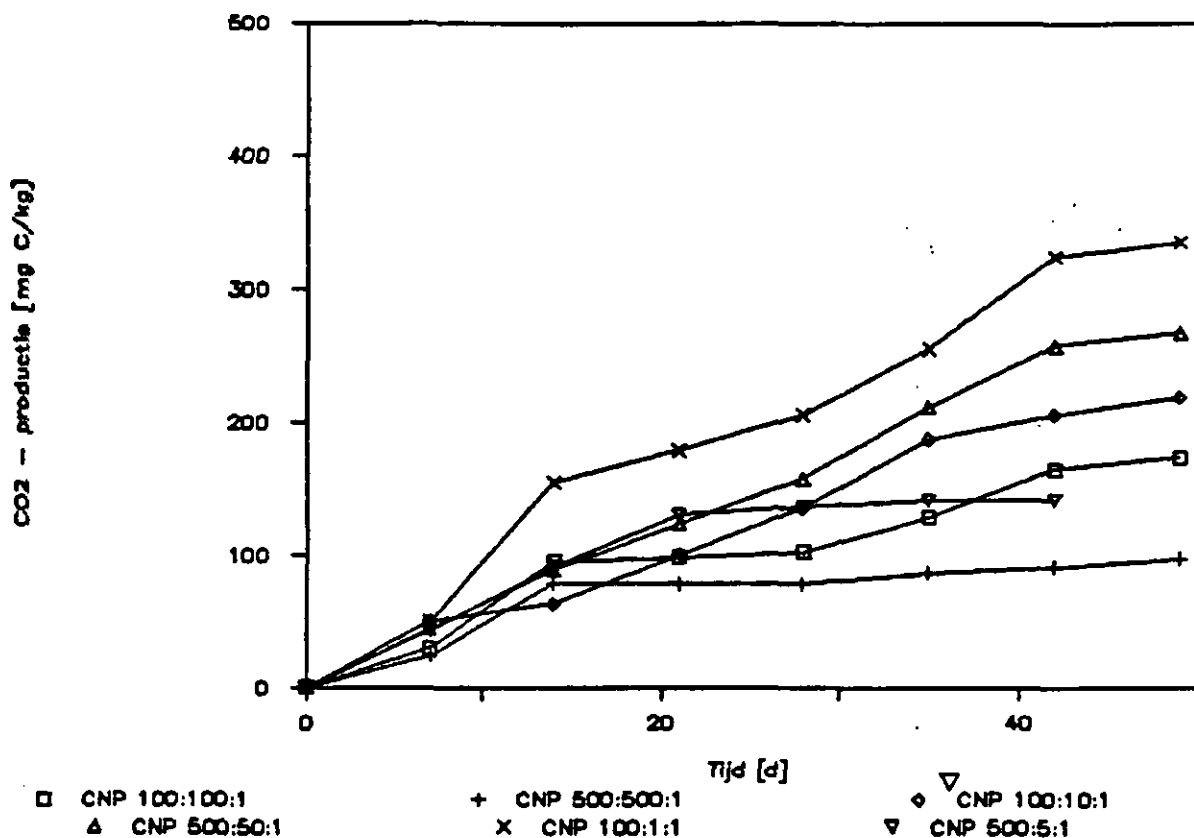
Figuur 1. Invloed van de C-N-P verhouding op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], met KNO_3 als N-bron. Concentratie benzine: 800 mg C/kg.



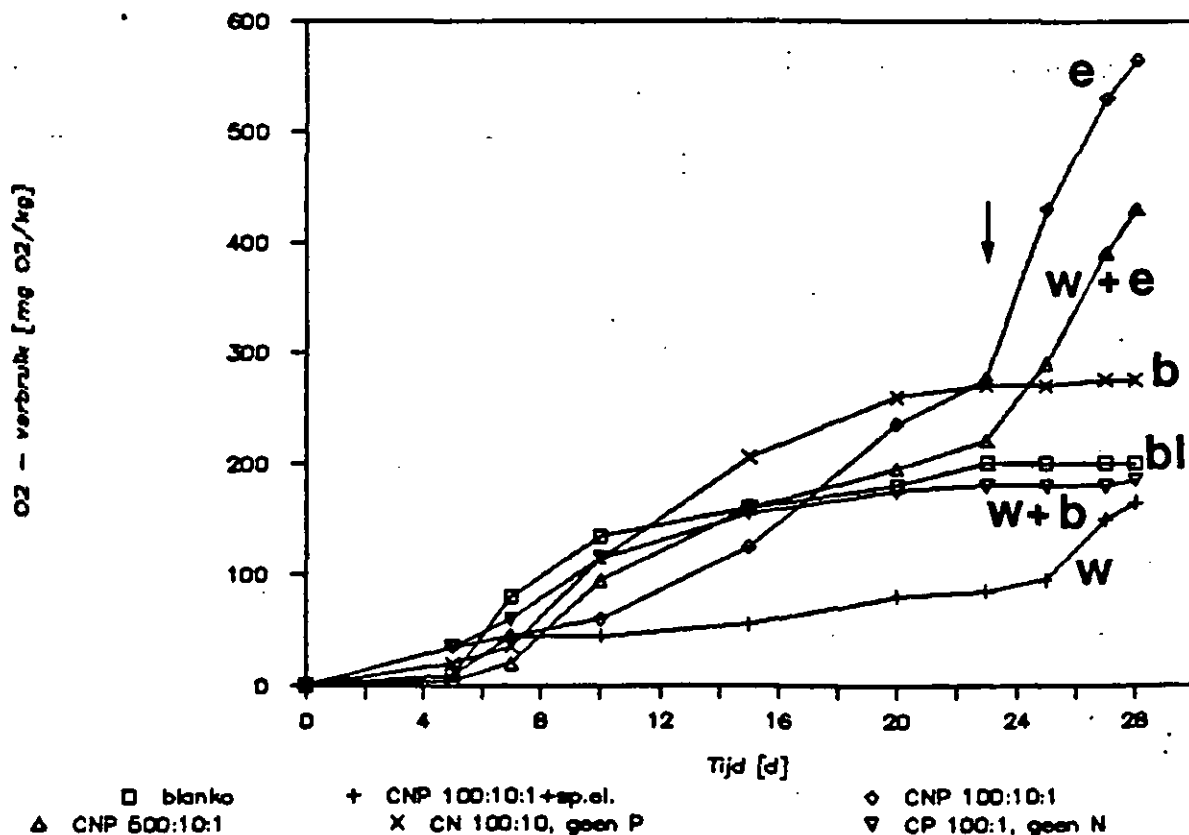
Figuur 2. Invloed van de C-N-P verhouding op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], met NH_4NO_3 als N-bron. Concentratie benzine: 800 mg C/kg.



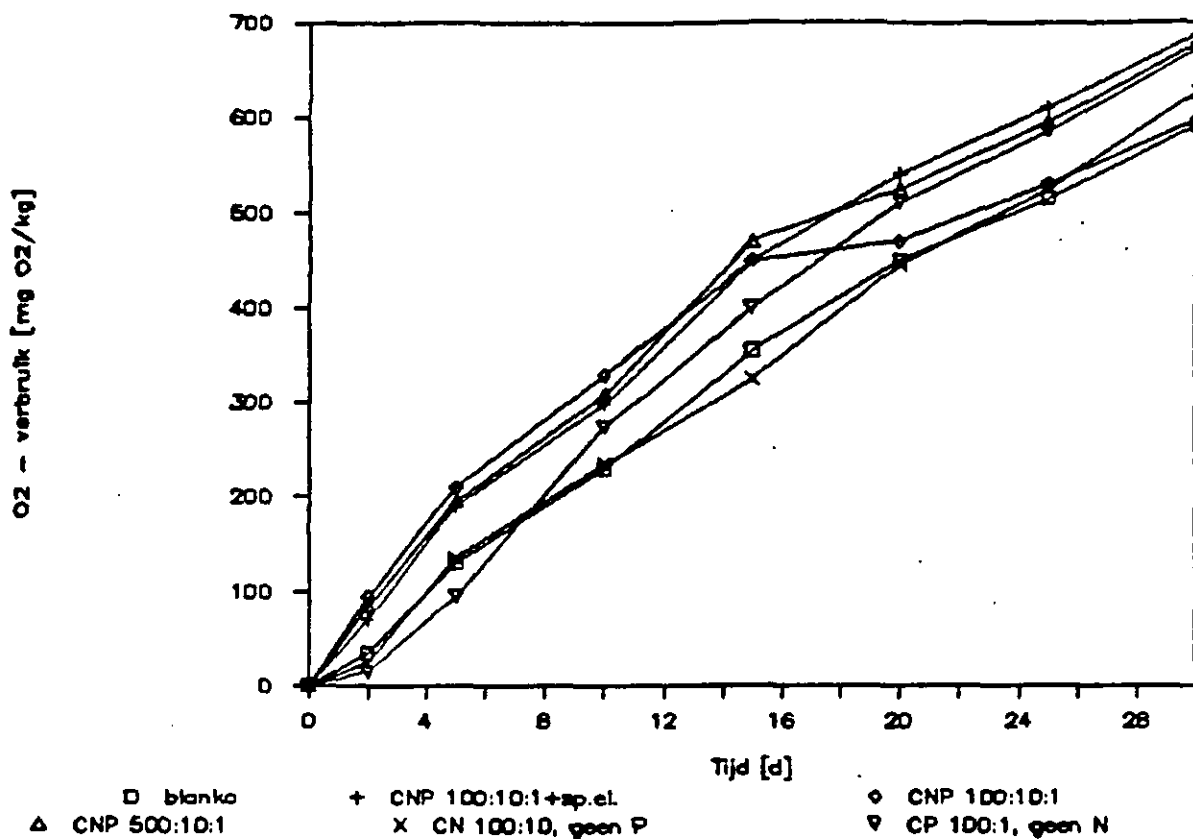
Figuur 3. Invloed van de C-N-P verhouding op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], met NH_4Cl als N-bron. Concentratie benzine: 800 mg C/kg.



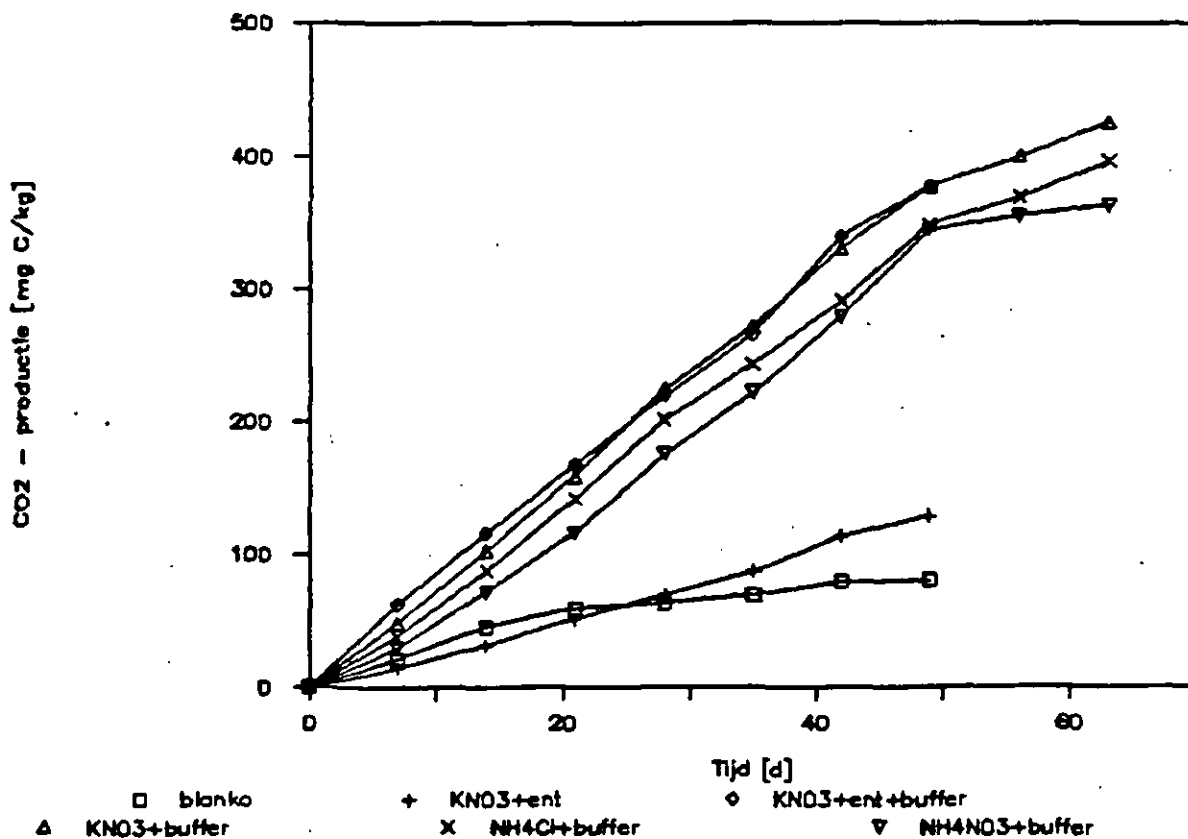
Figuur 4. Invloed van de C-N-P verhouding op de benzine-afbraak, gemeten als O_2 verbruik [mg O_2 /kg], met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N bron. Concentratie benzine: 850 mg/kg. Op dag 23 zijn ter stimulering van de afbraak verschillende toevoegingen gedaan: water (+, Δ, ▽), neutrale buffer (x, ▽) en entmateriaal (◇, Δ), eventueel in combinatie.



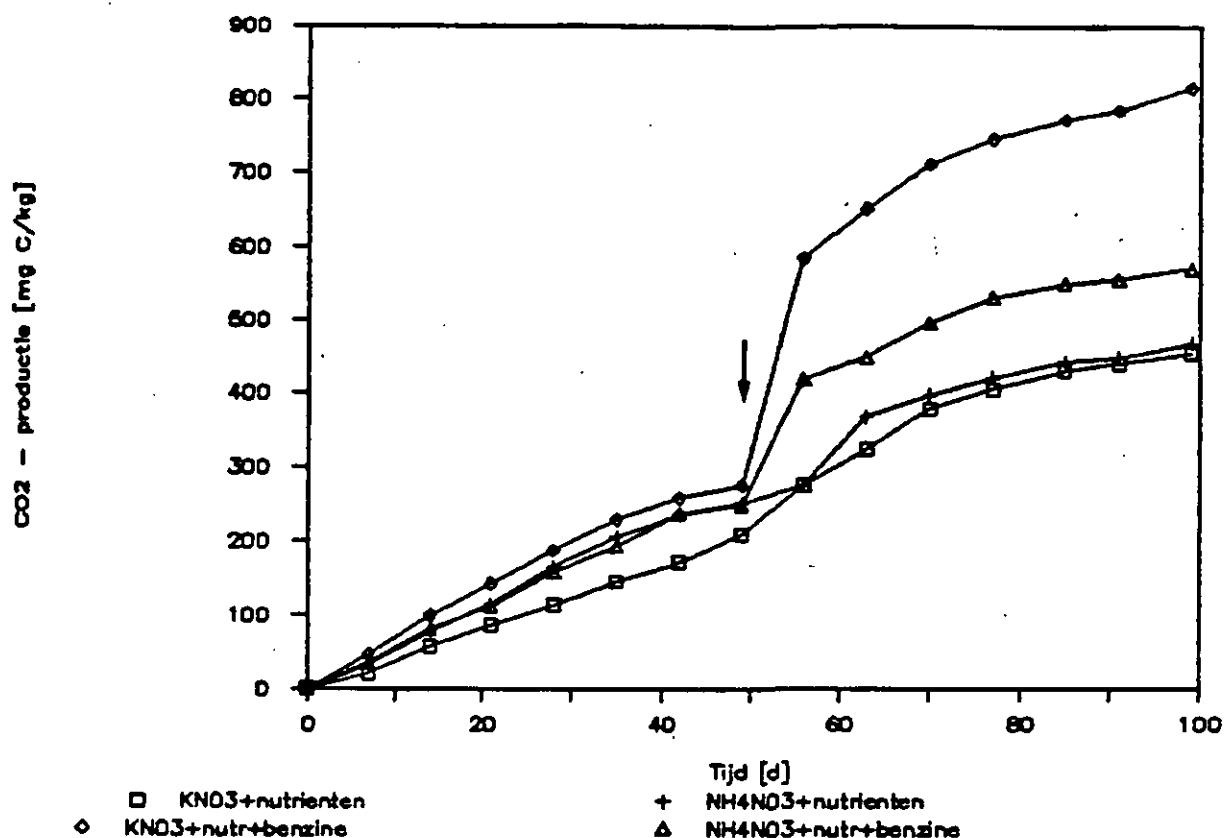
Figuur 5. Invloed van de C-N-P verhouding op de benzine-afbraak, gemeten als O_2 verbruik [$mg O_2/kg$], met $(NH_4)_2SO_4$ als N bron en met KONI grond (20 g/kg) als entmateriaal (extra biomassa). Concentratie benzine: 850 mg/kg.



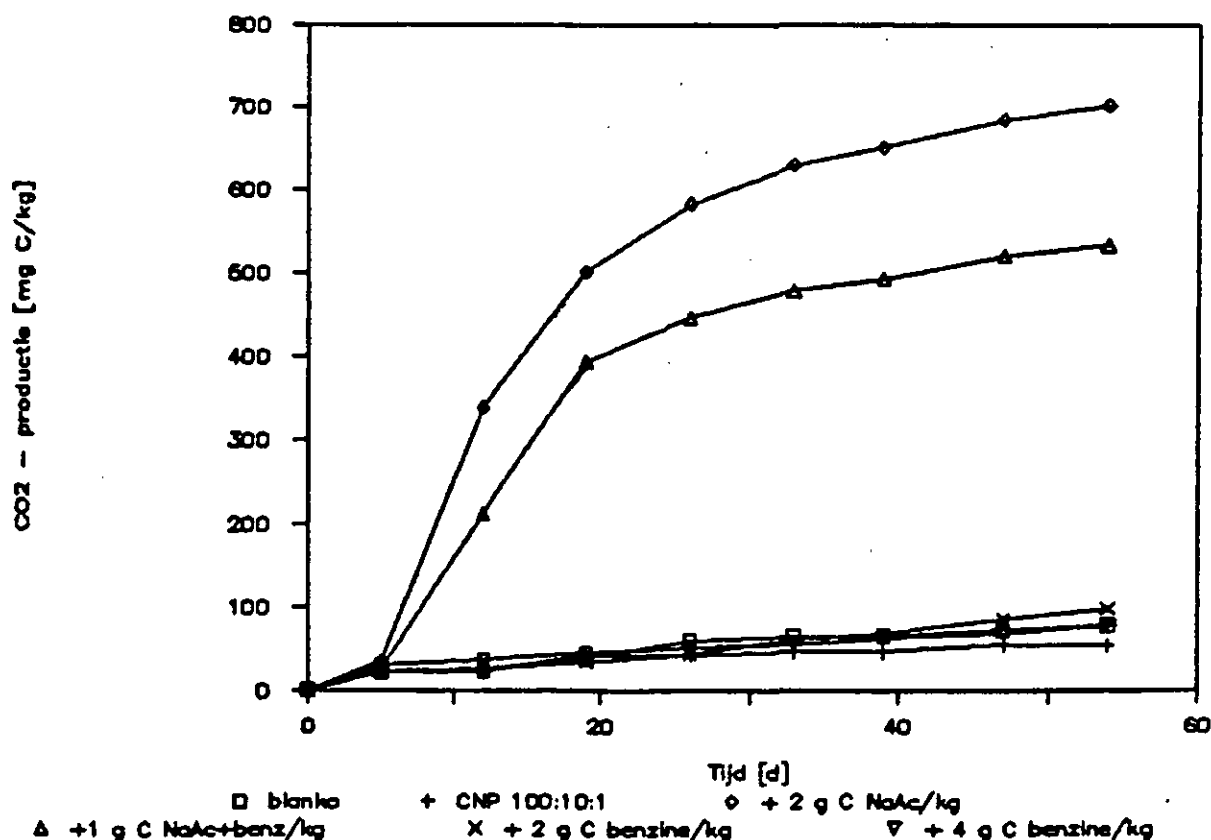
Figuur 6. Invloed van enting (10 ml/kg kweek FINA grond) en buffering (pH 7.5 met K-fosfaatbuffer) op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [$mg C/kg$]. C-N-P verhouding 100-10-1. Concentratie benzine: 800 mg C/kg.

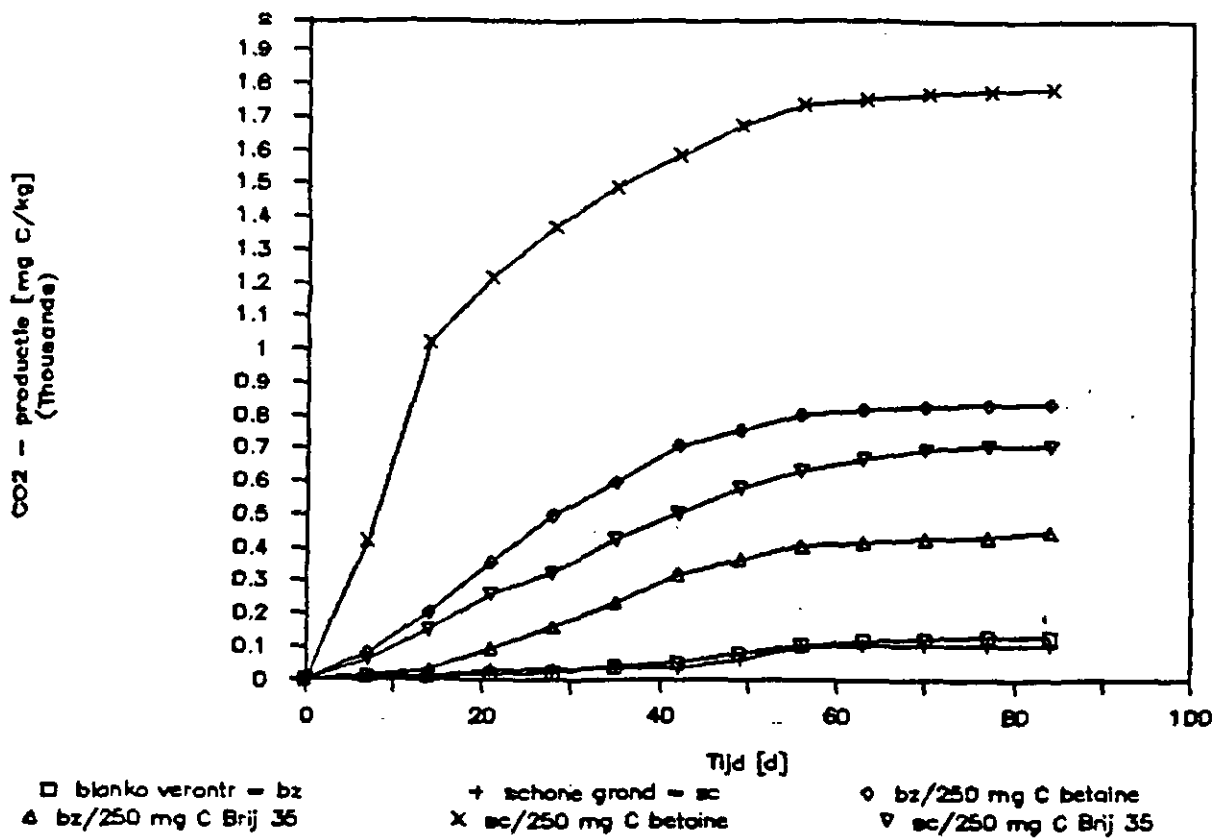


Figuur 7. Invloed van het toevoegen op dag 49 van nutriënten (80 mg N/kg en 8 mg P/kg) en benzine (3000 mg/kg) op de afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], nadat incubatie van de benzine verontreinigde grond (800 mg C/kg) heeft plaatsgevonden. C-N-P verhouding 100-10-1. Als N bron is zowel KNO_3 als NH_4NO_3 gebruikt.



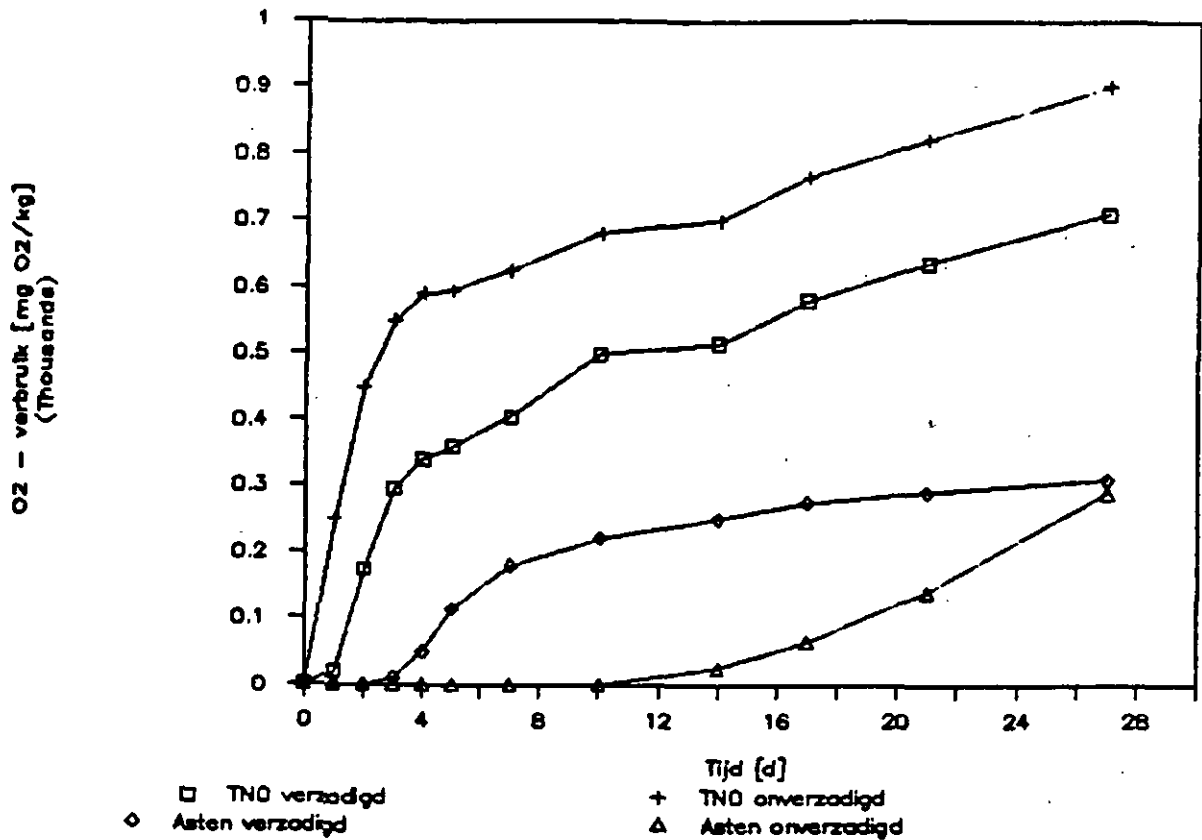
Figuur 8. Afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], van natriumacetaat (1000 en 2000 mg C/kg) en benzine (2000 en 4000 mg C/kg) al dan niet in combinatie toegevoegd aan schone Asten grond. C-N-P verhouding 100-10-1.



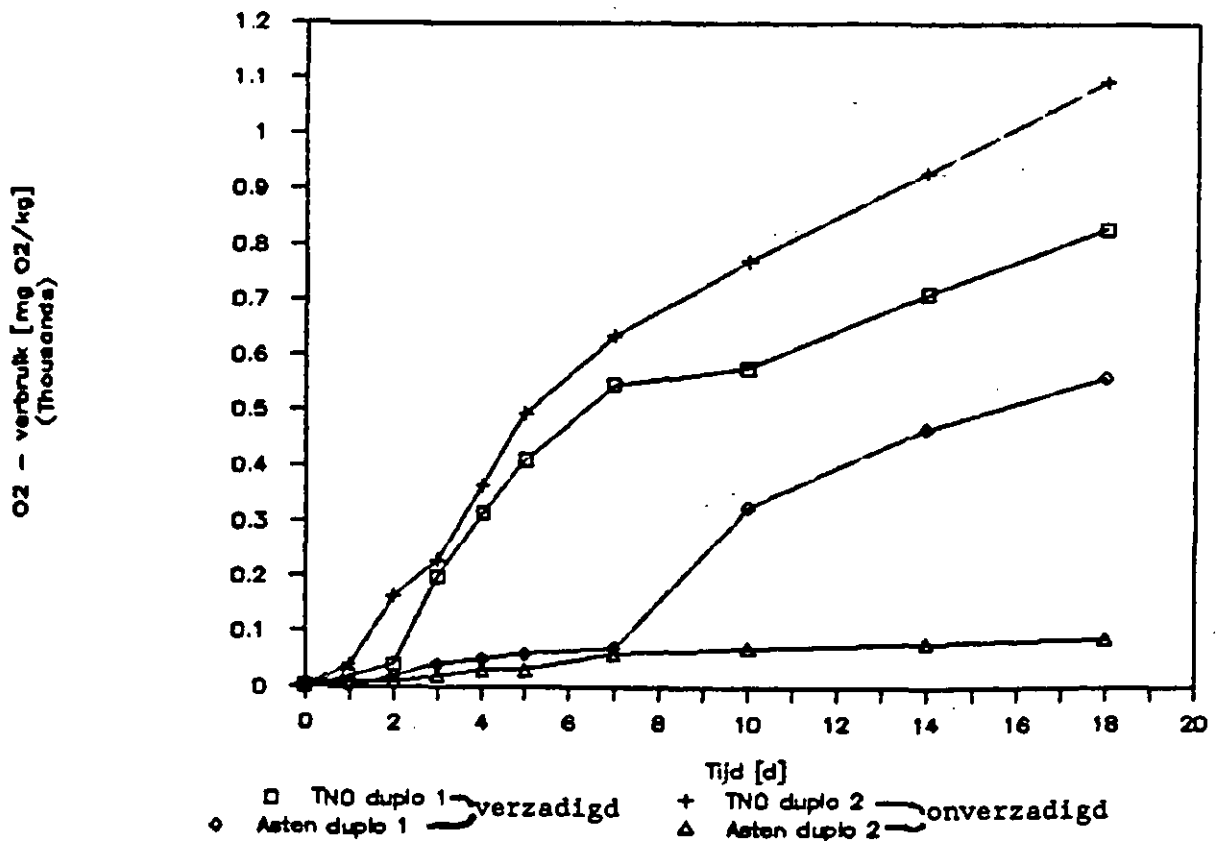


Figuur 9. Afbraak van detergenten (2500 mg C/kg) in schone grond (SC) en de invloed van detergenten (2500 mg C/kg) op de benzine-afbraak, gemeten als CO₂ productie [mg C/kg]. Concentratie benzine in verontreinigde grond (BZ): 3500 mg/kg. C-N-P verhouding 100-10-1.

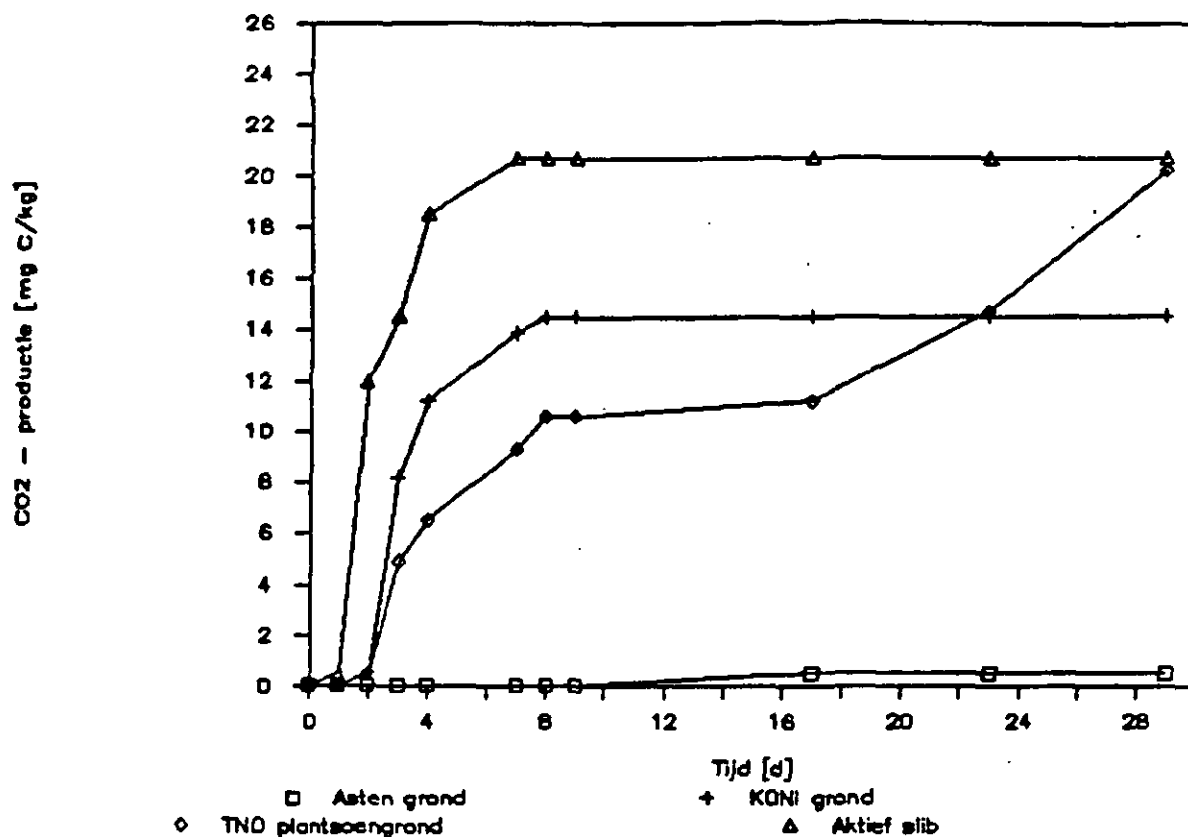
Figuur 10. Afbraak, gemeten als O_2 verbruik [$mg\ O_2/kg$], van natriumacetaat in schone Asten grond en TNO plantsoengrond, al dan niet met water verzadigd.



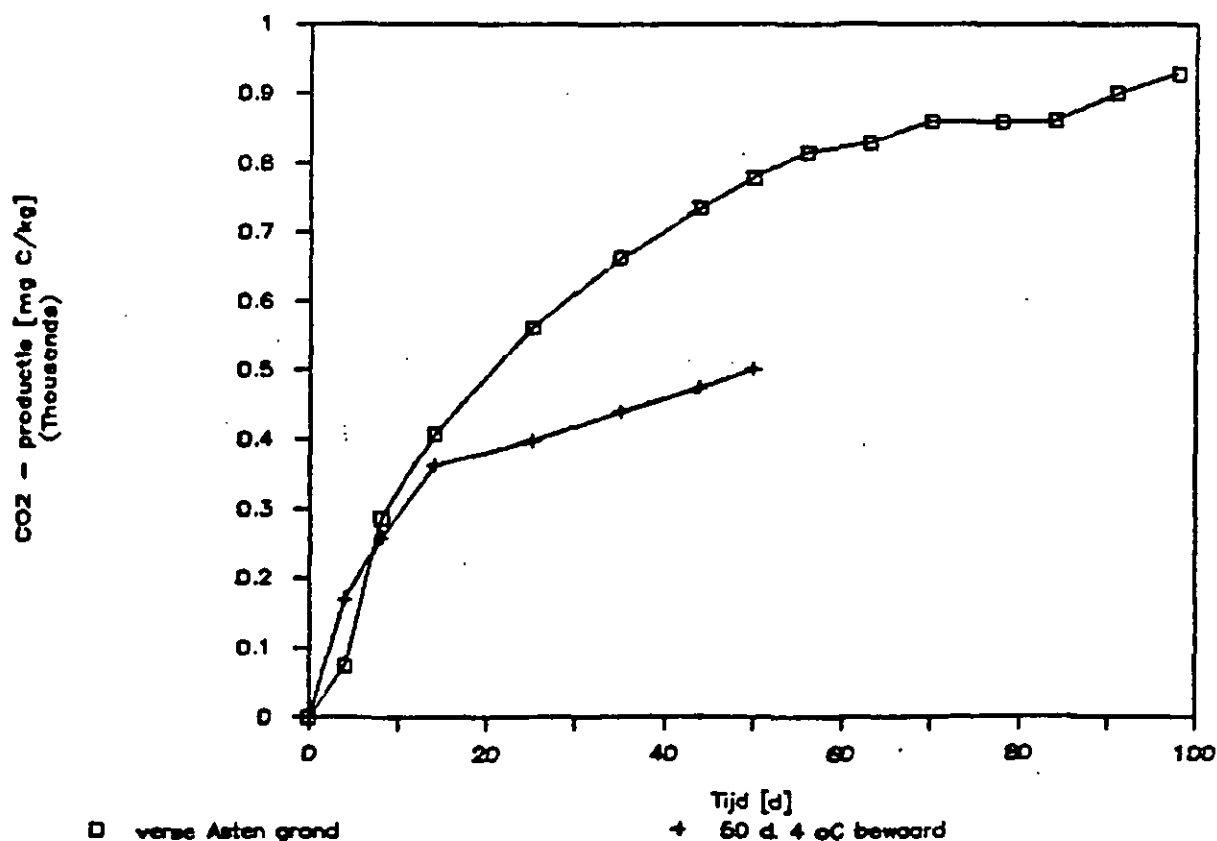
Figuur 11. Vervolg op proef van figuur 10. Afbraak, gemeten als O_2 verbruik [$mg\ O_2/kg$], van benzine (1000 mg/kg) die toegevoegd is aan schone Asten en TNO plantsoengrond 27 dagen na incubatie van grond waaraan natriumacetaat was toegevoegd.



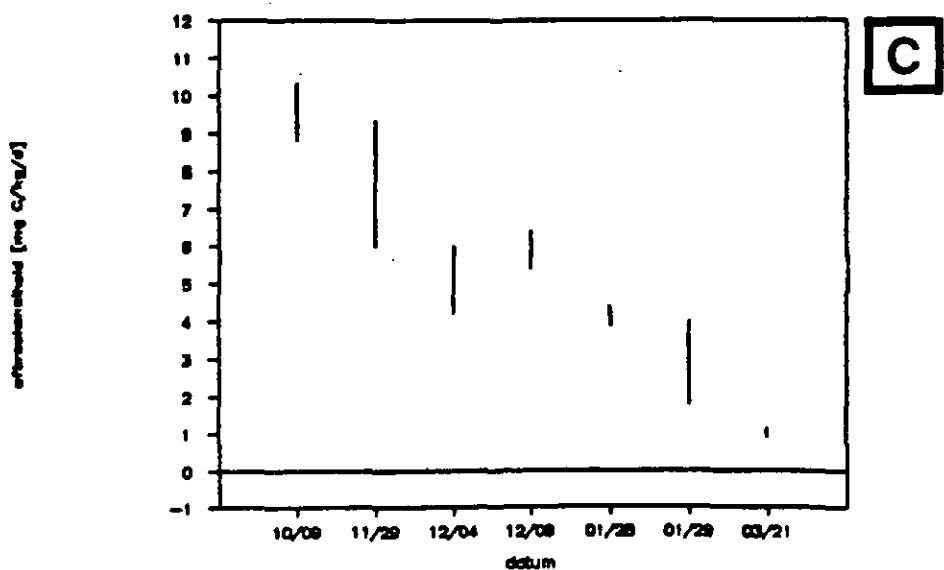
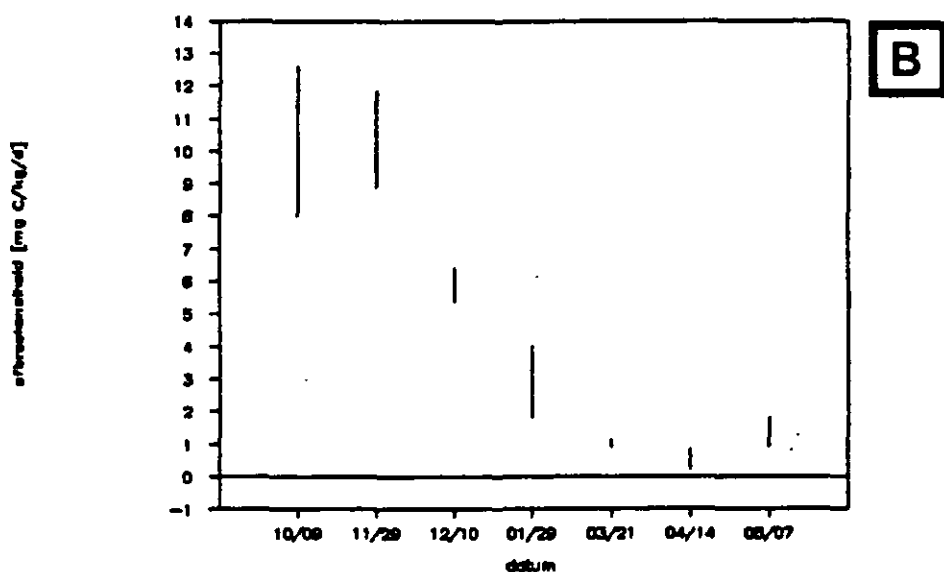
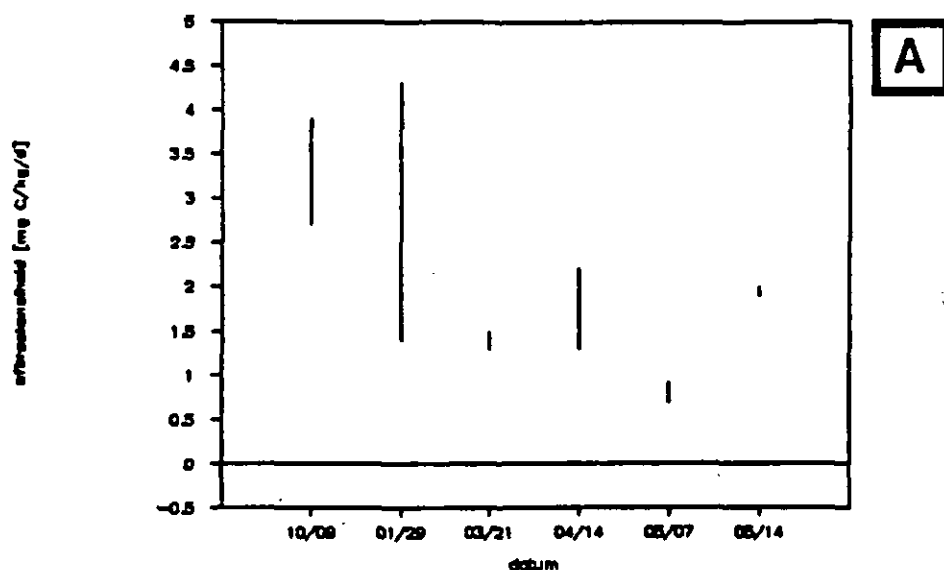
Figuur 12. Afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], van benzine (500 mg/l) in een waterig medium met verschillende entmaterialen (5 g/l): Asten grond, KONI grond, TNO grond en actief slib.



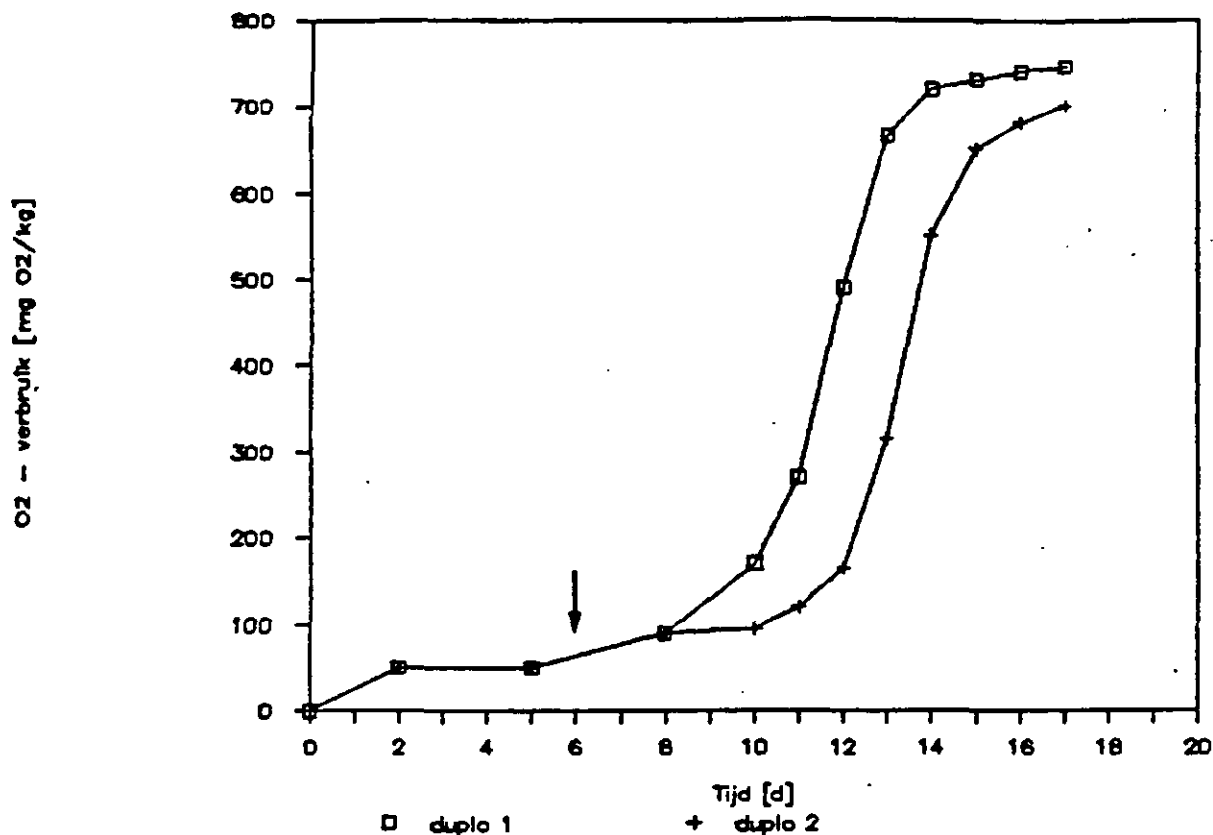
Figuur 13. Invloed van het bewaren bij 4 °C op de activiteit van Asten grond. Als de activiteit is gemeten de benzine-afbraak in de vorm van de CO_2 productie [mg C/kg]. C-N-P verhouding 100-10-10. Concentratie benzine 3000 mg/kg.



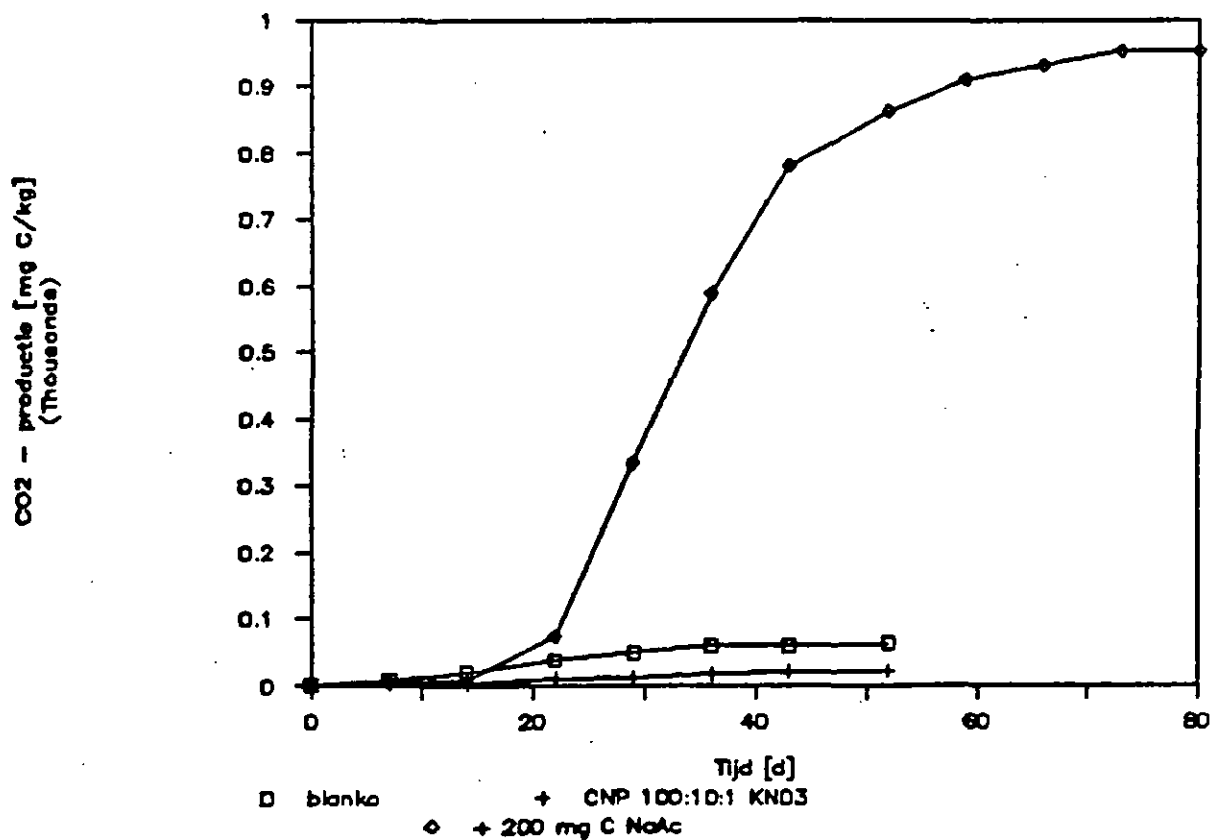
Figuur 14. Invloed van ingevroren (-20 °C) bewaren van de genomen grondmonsters op de biomassa-activiteit, gemeten als de benzine-afbraak in de vorm van de CO₂ productie [mg C/kg]. Weergegeven zijn drie series experimenten: A. blánko, B. KNO₃ C-N-P 100-10-1, C. KNO₃ C-N-P 500-5-1.



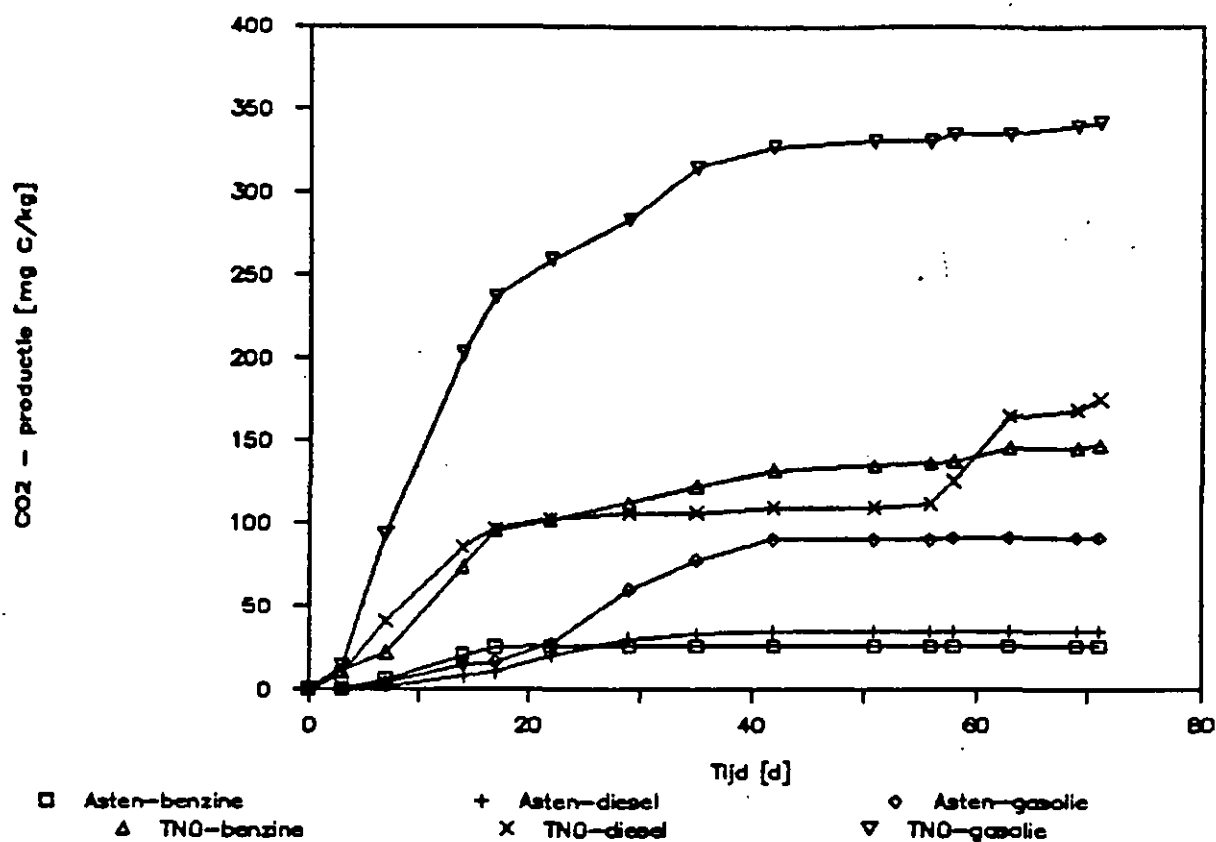
Figuur 15. Afbraak, gemeten als O_2 verbruik [mg O_2 /kg], van natriumacetaat in schone Asten grond. C-N-P verhouding 100-10-1. Op dag 6 is water toegevoegd.



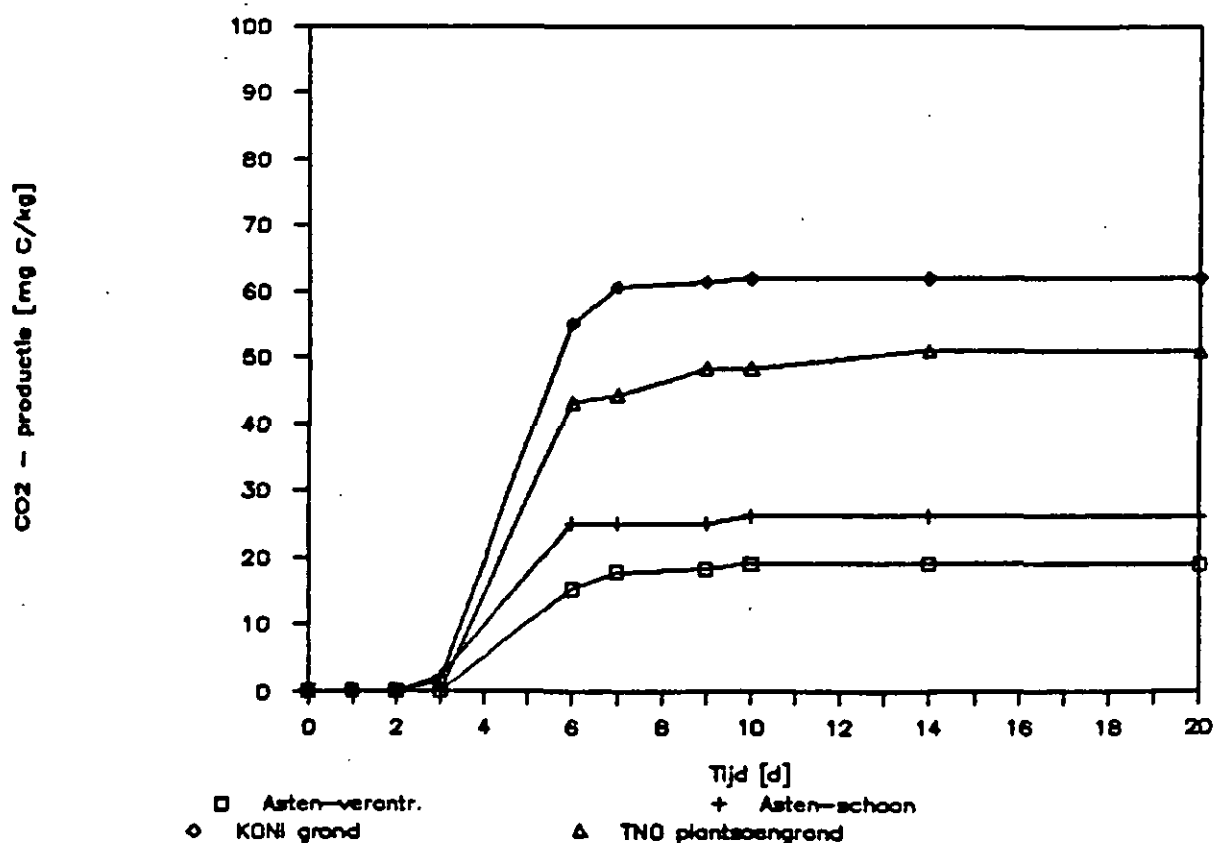
Figuur 16. Invloed van het toevoegen van natriumacetaat (2000 mg C/kg) op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg]. C-N verhouding 100-10. Concentratie benzine 3500 mg/kg.



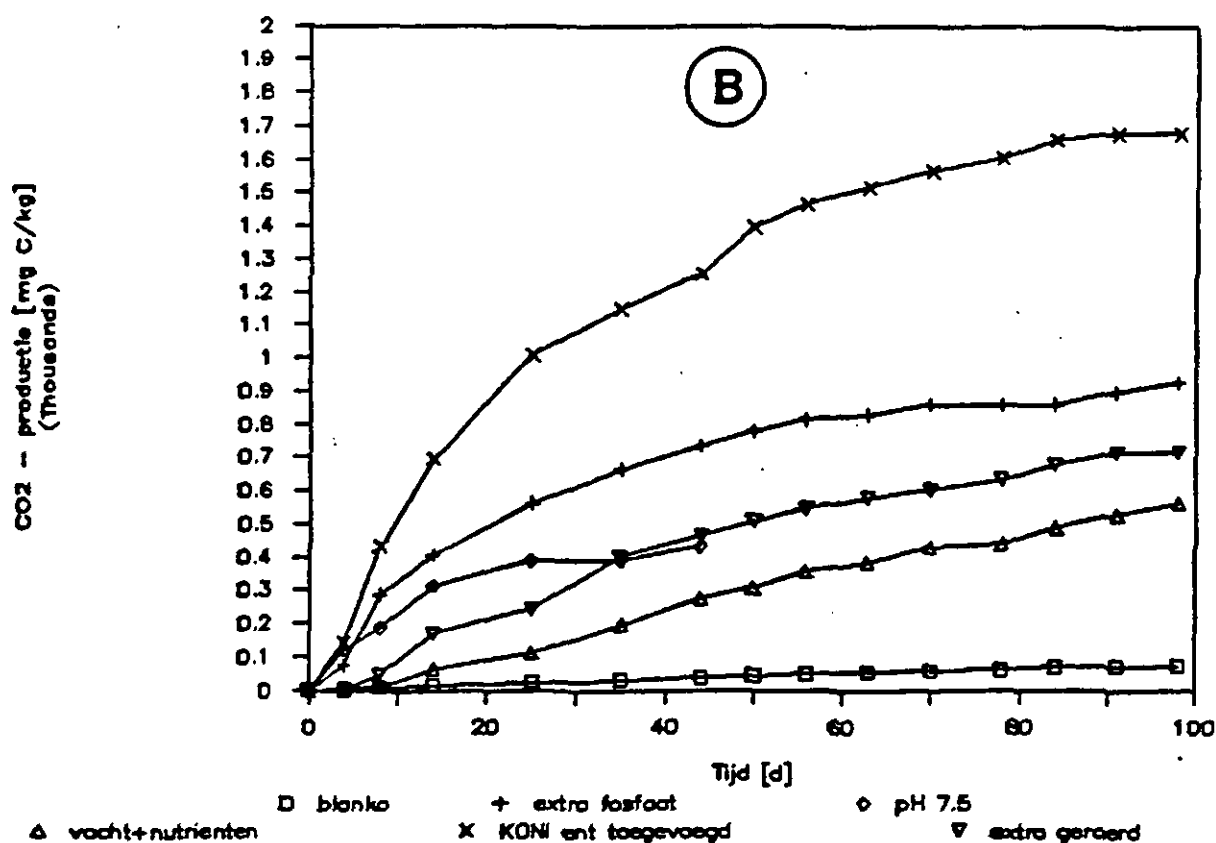
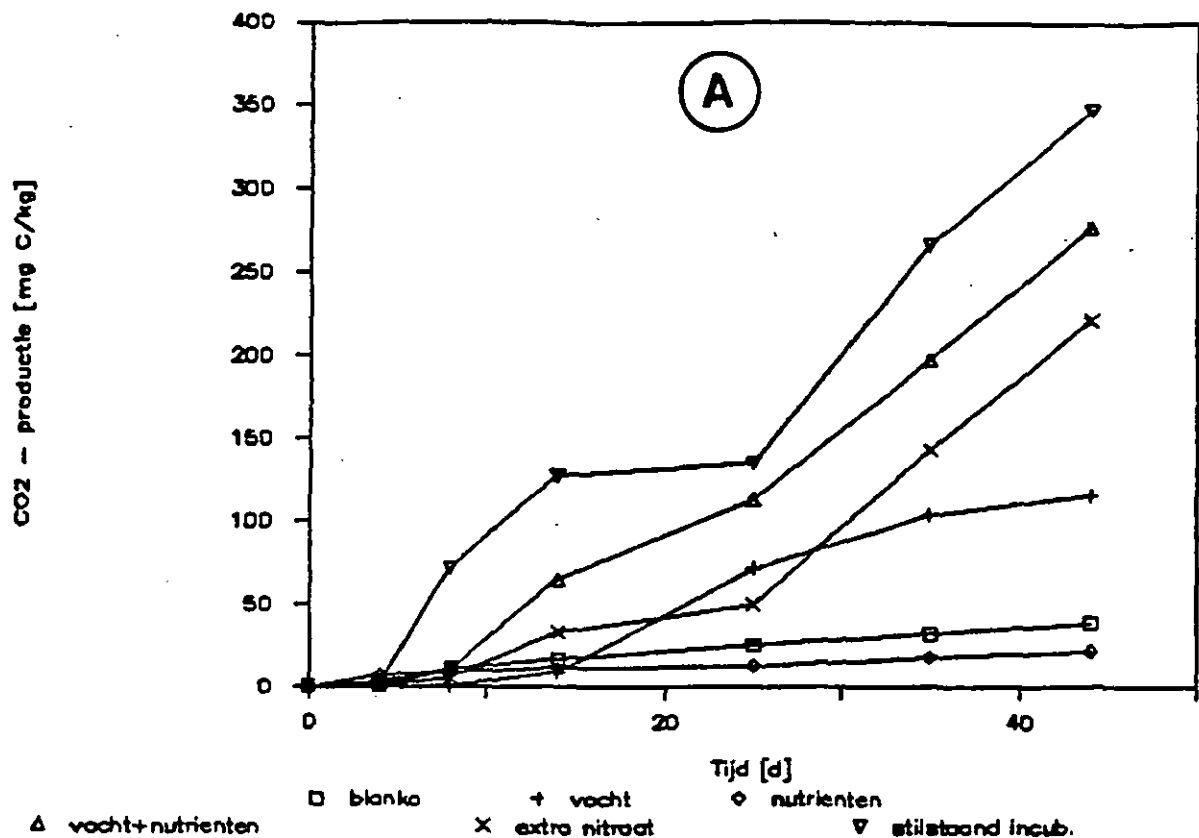
Figuur 17. Afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], van dieselolie, gasolie en benzine (concentraties 1000 mg C/kg) in Asten grond en TNO plantsoengrond.



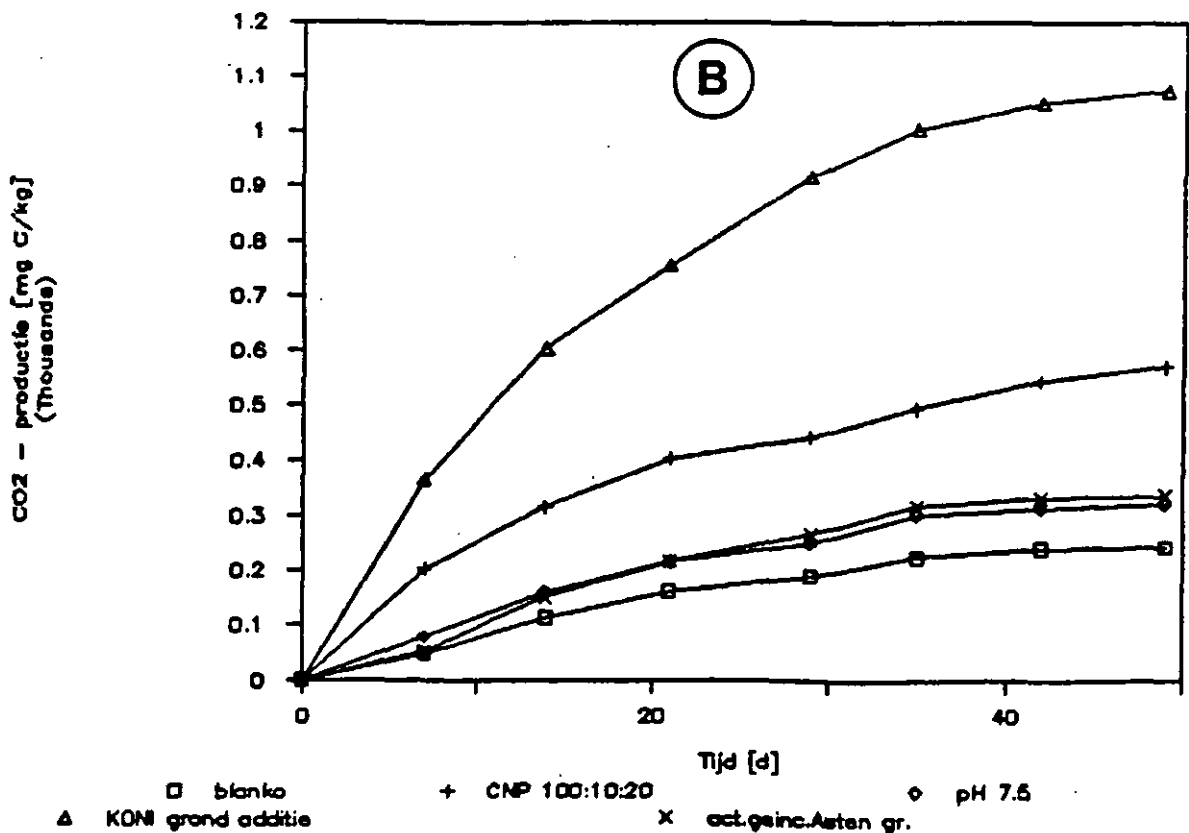
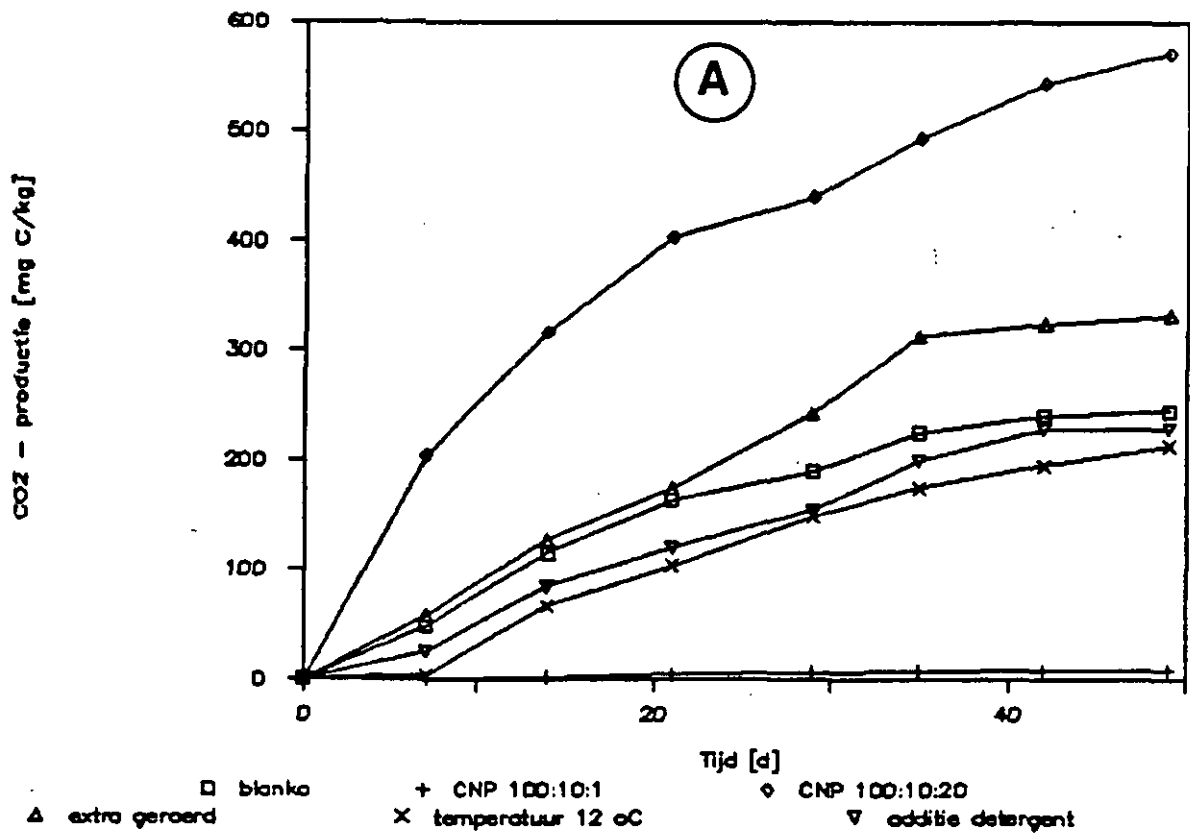
Figuur 18. Afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg], van benzine (500 mg/l) in een waterig medium met verschillende entmaterialen (5 g/l): schone en verontreinigde Asten grond, KONI grond en TNO grond.



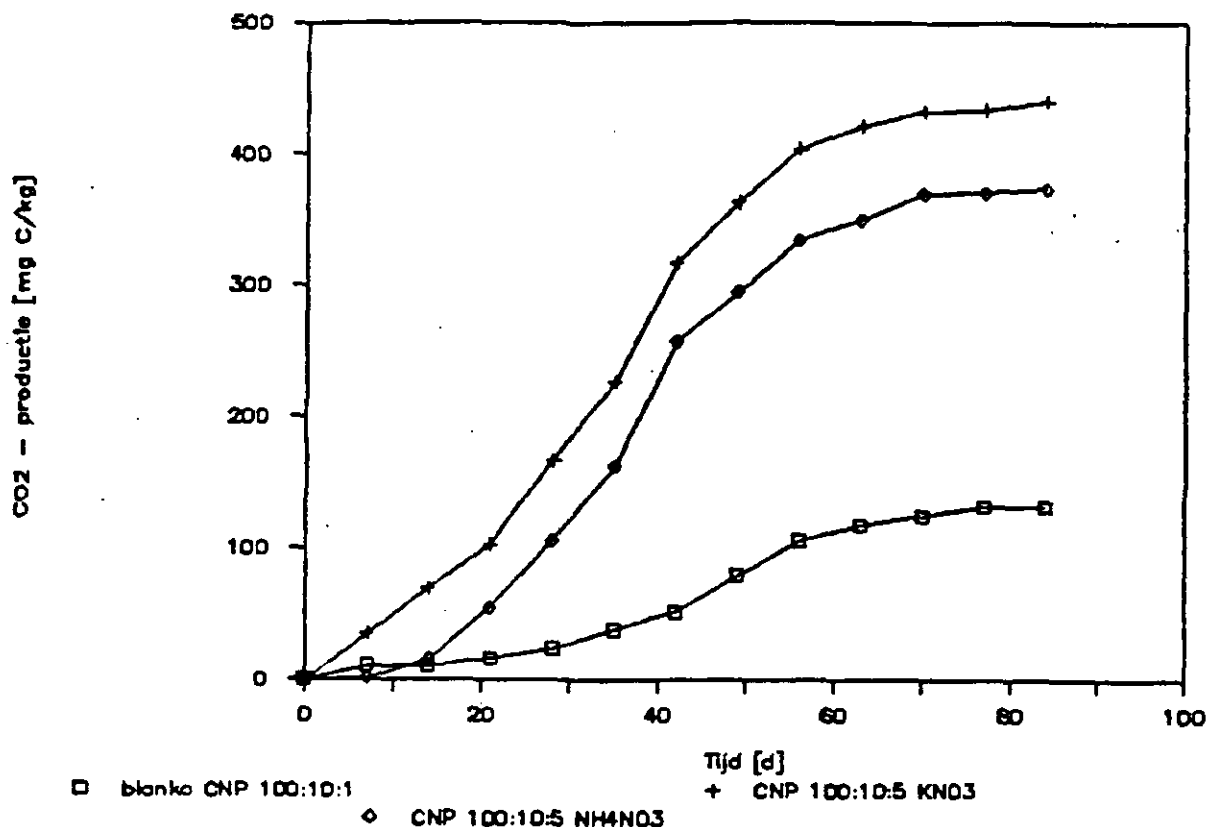
Figuur 19. Invloed van verschillende factoren op de benzine-afbraak, gemeten als de CO_2 productie [mg C/kg]. Concentratie benzine 3000-5700 mg/kg. C-N-P verhouding, indien toegevoegd 100-10-1. A. vocht en/of nutriënten, stilstaand incuberen en extra nitraat (500 mg KNO_3/kg); B. fosfaatdosering (C-P 100-5), roerend incuberen, buffering (pH 7.0 NaHCO_3), en toevoegen KONI grond (50 g/kg).



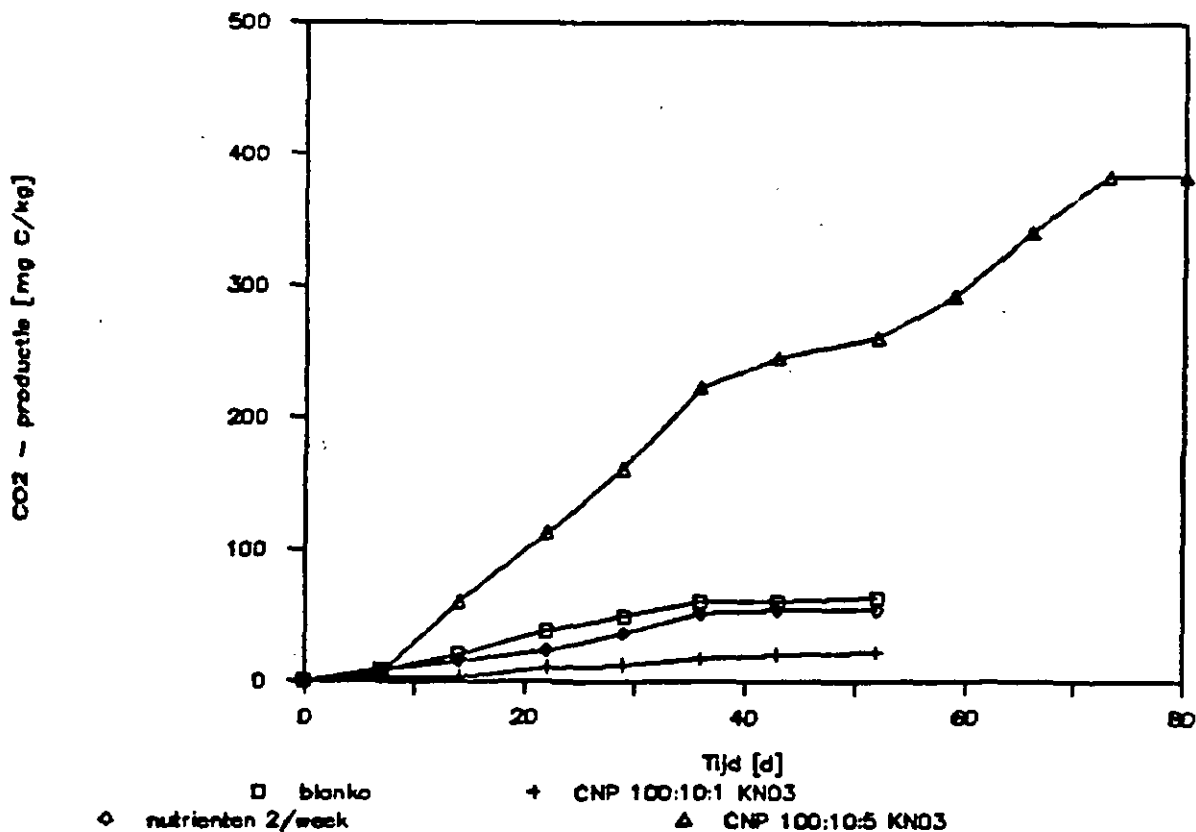
Figuur 20. Invloed van verschillende factoren op de benzine-afbraak, gemeten als de CO_2 productie [mg C/kg]. Concentratie benzine 3000-5700 mg/kg. C-N-P verhouding, indien toegevoegd 100-10-10. A. temperatuur (12°C), toevoegen detergent (Tween), fosfaatdosering (C-P 100-1 tot 100-20); B. buffering (pH 7.5 fosfaat) en toevoegen entmateriaal (50 g/kg actieve Asten grond en KONI grond).



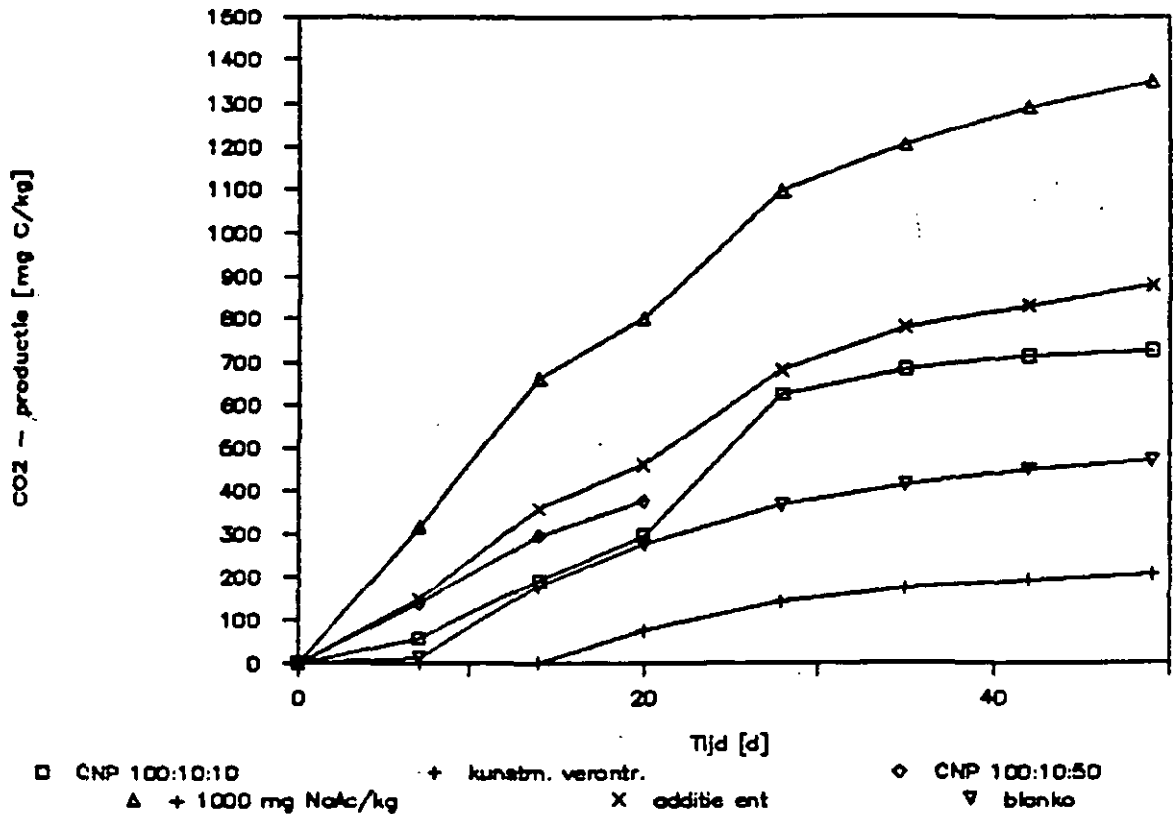
Figuur 21. Invloed van een verhoogde fosfaatsdosering (C-N-P verhouding 100-10-5) op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg]. Concentratie benzine in verontreinigde grond: 3500 mg/kg. C-N-P verhouding 100-10-1.



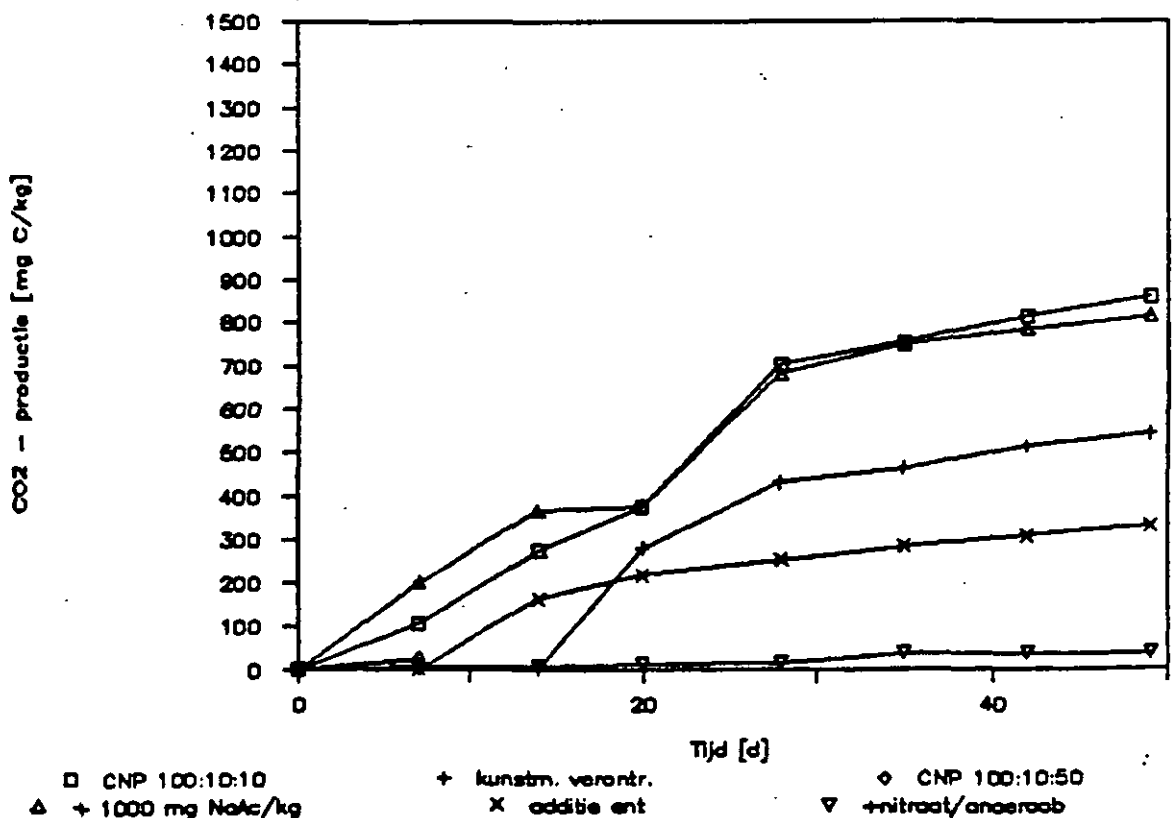
Figuur 22. Invloed van de fosfaatsdosering (C-P verhouding van geen fosfaat tot 100-5) op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg]. C-N verhouding 100-10. Concentratie benzine 3500 mg/kg.



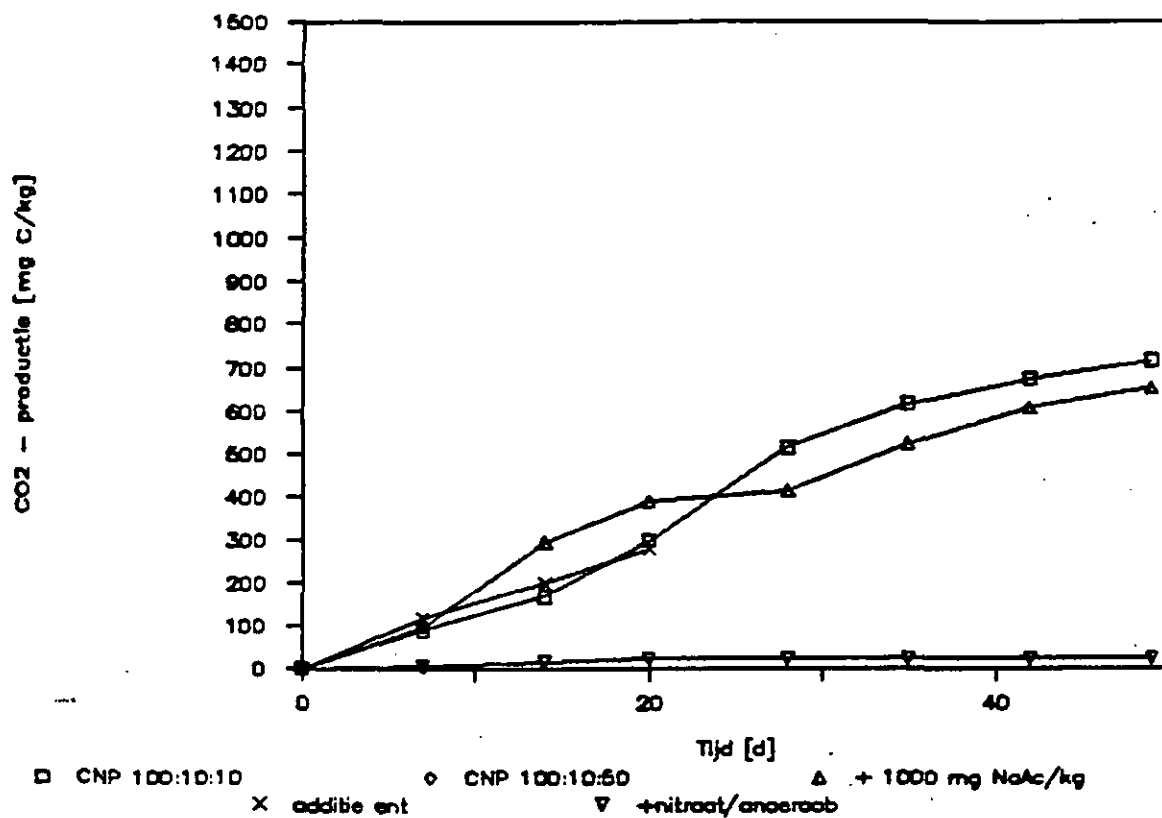
Figuur 23. Invloed van verschillende factoren op de benzine-afbraak, gemeten als de CO_2 productie [mg C/kg]. C-N-P verhouding, indien toegevoegd 100-10-10. Als factoren zijn onderzocht: toevoegen natriumacetaat (500 mg/kg), entmateriaal (20 ml/kg kweek FINA grond), hogere fosfaatdosering (C-P 100-50), nitrattoevoeging (500 mg KNO_3/kg) al dan niet anaeroob, historische versus kunstmatige verontreiniging en weglaten nutriëntentoevoeging. Benzine concentratie 5400 mg/kg.



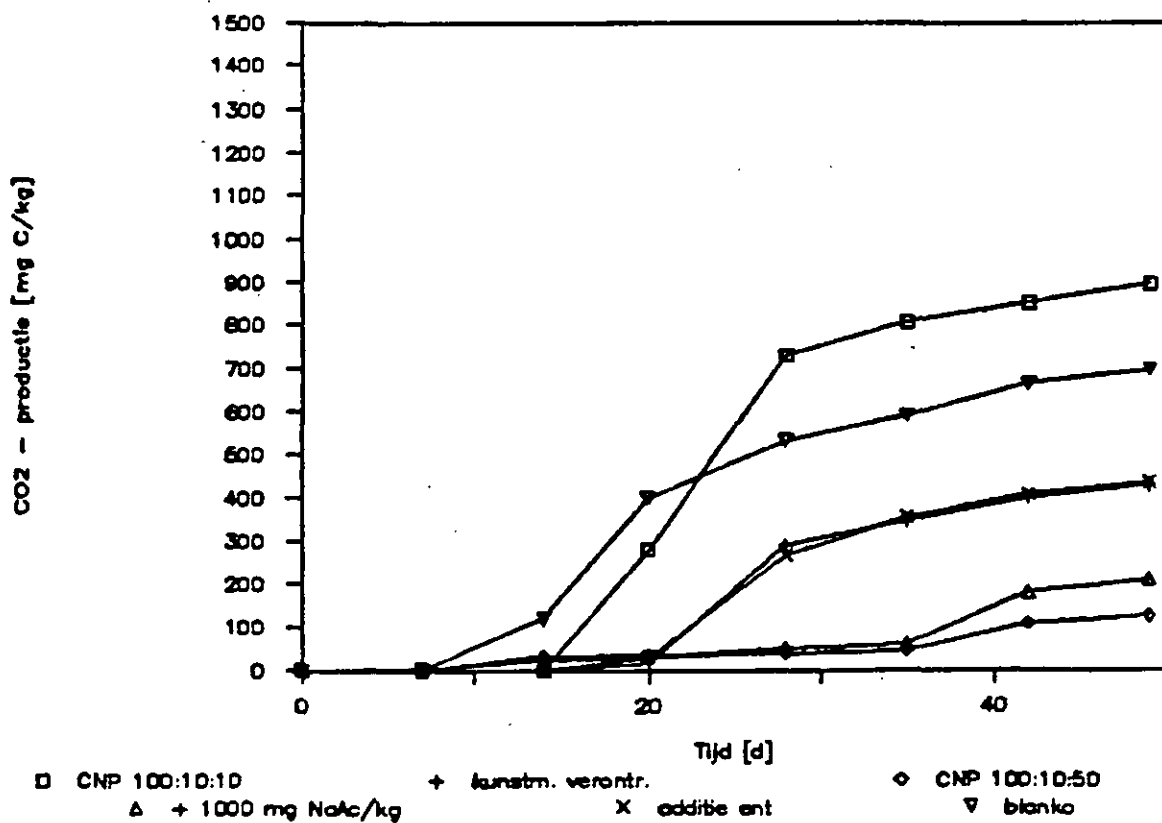
Figuur 24. Als figuur 23, concentratie benzine 9300 mg/kg.



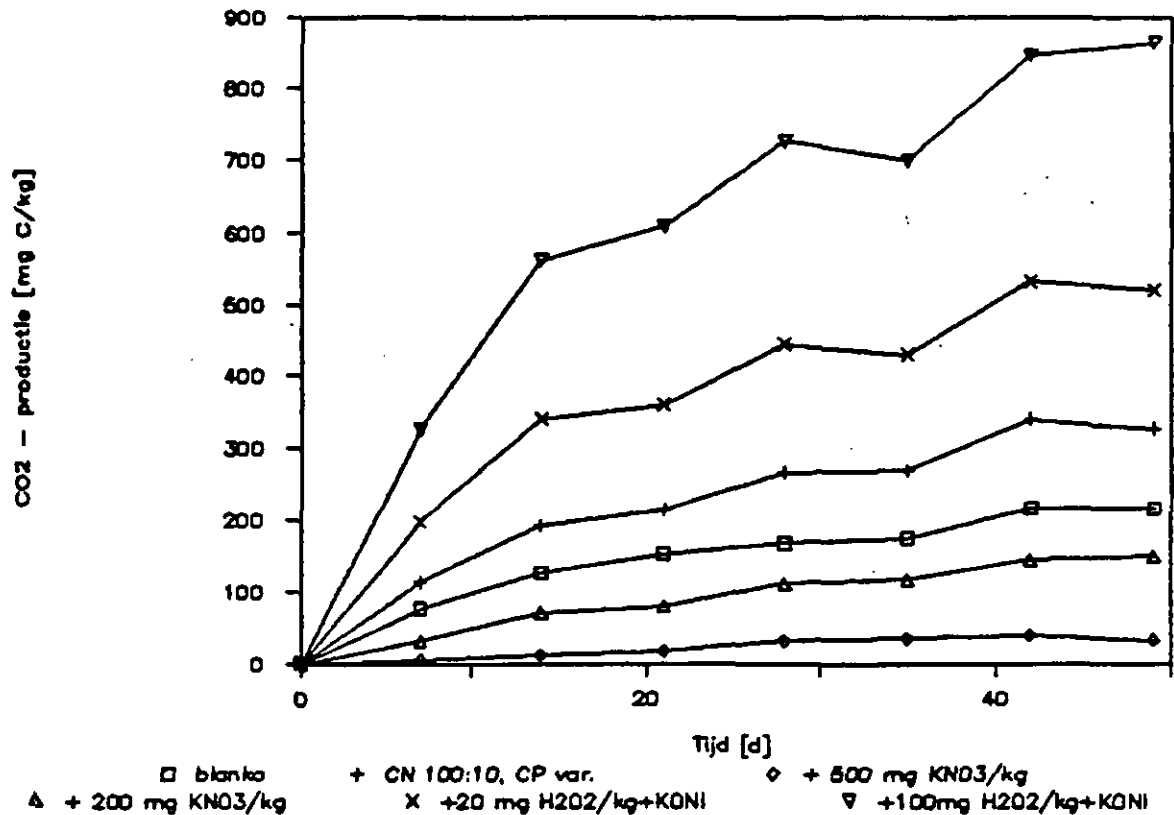
Figuur 25. Als figuur 23, concentratie benzine 5400 mg/kg.



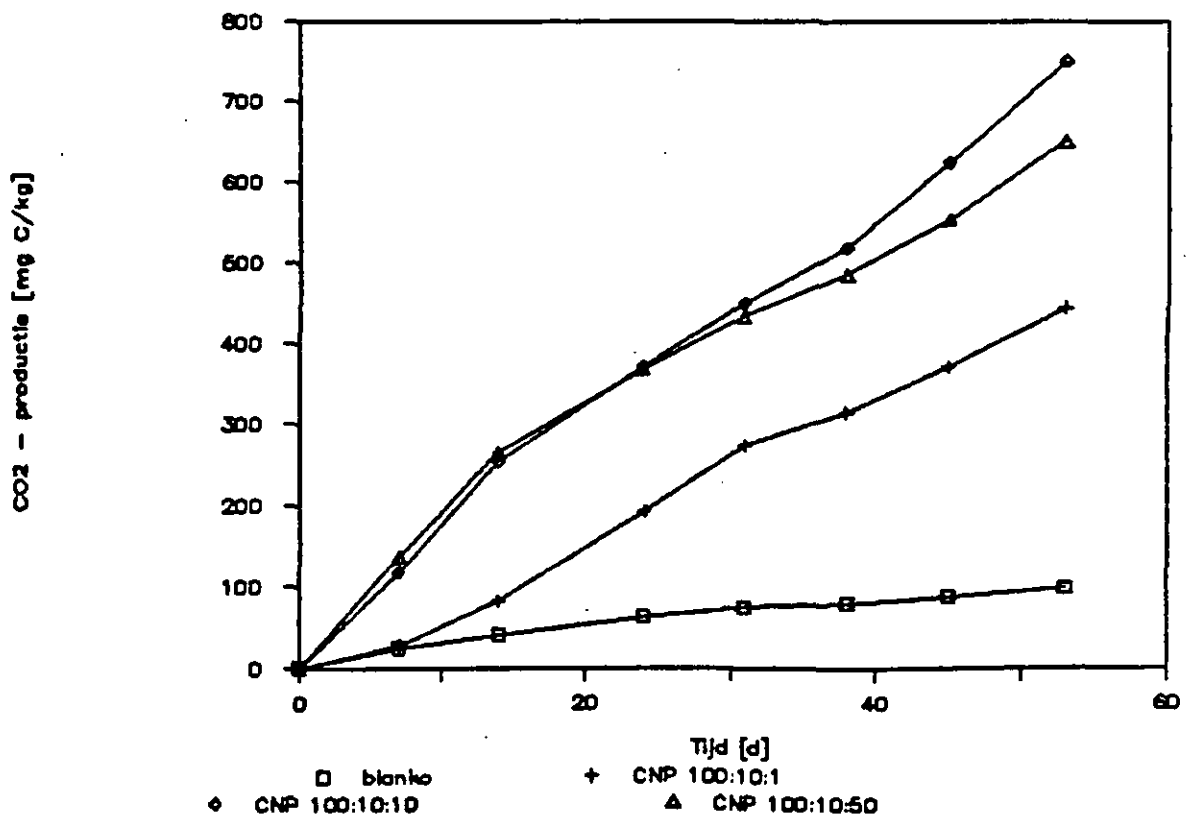
Figuur 26. Als figuur 23, concentratie benzine 12000 mg/kg.



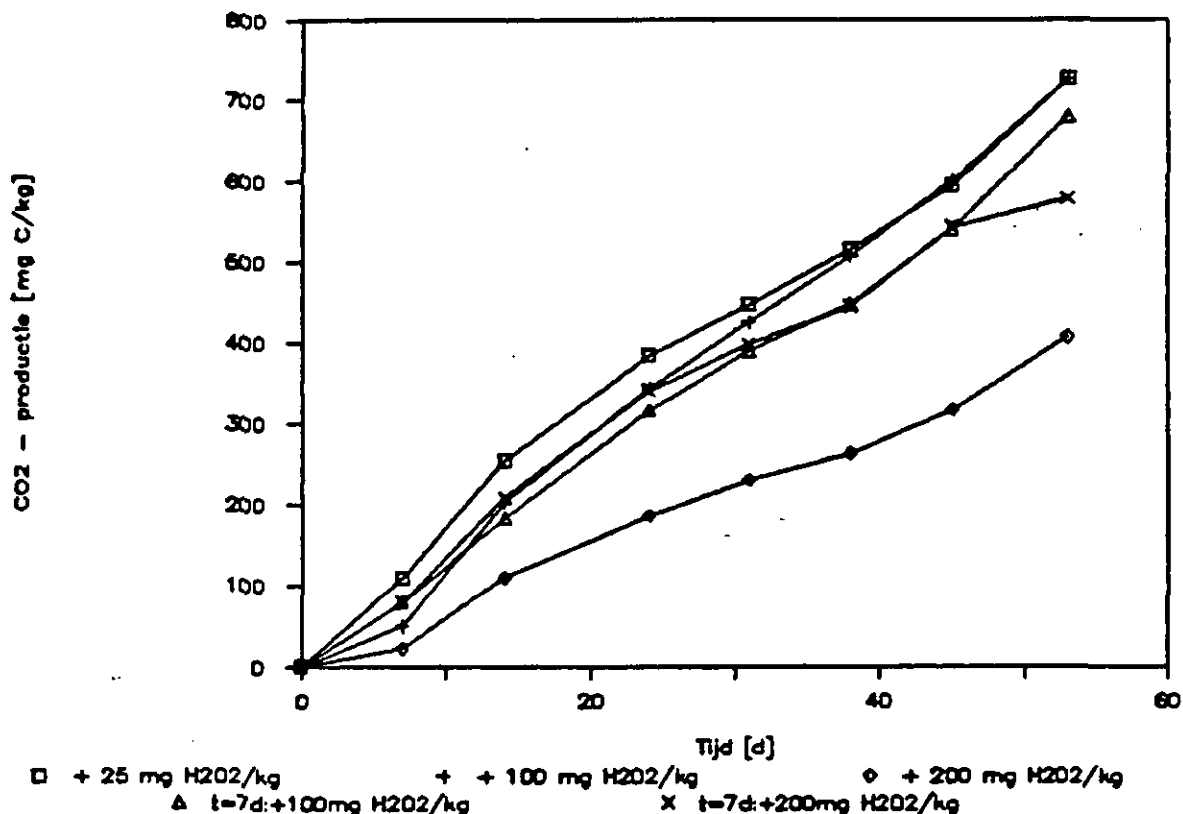
Figuur 27. Invloed van de fosfaatsdosering (C-N-P verhouding 100-10-1 tot 100-10-100), nitraatsdosering (200 en 500 mg KNO_3/kg) en waterstofperoxide (20 tot 100 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{kg}$) + KONI grond (50 g/kg) dosering op de benzine-afbraak, gemeten als CO_2 productie [mg C/kg]. Concentratie benzine 800 mg/kg. C-N-P verhouding 100-10-10 indien niet gevarieerd.



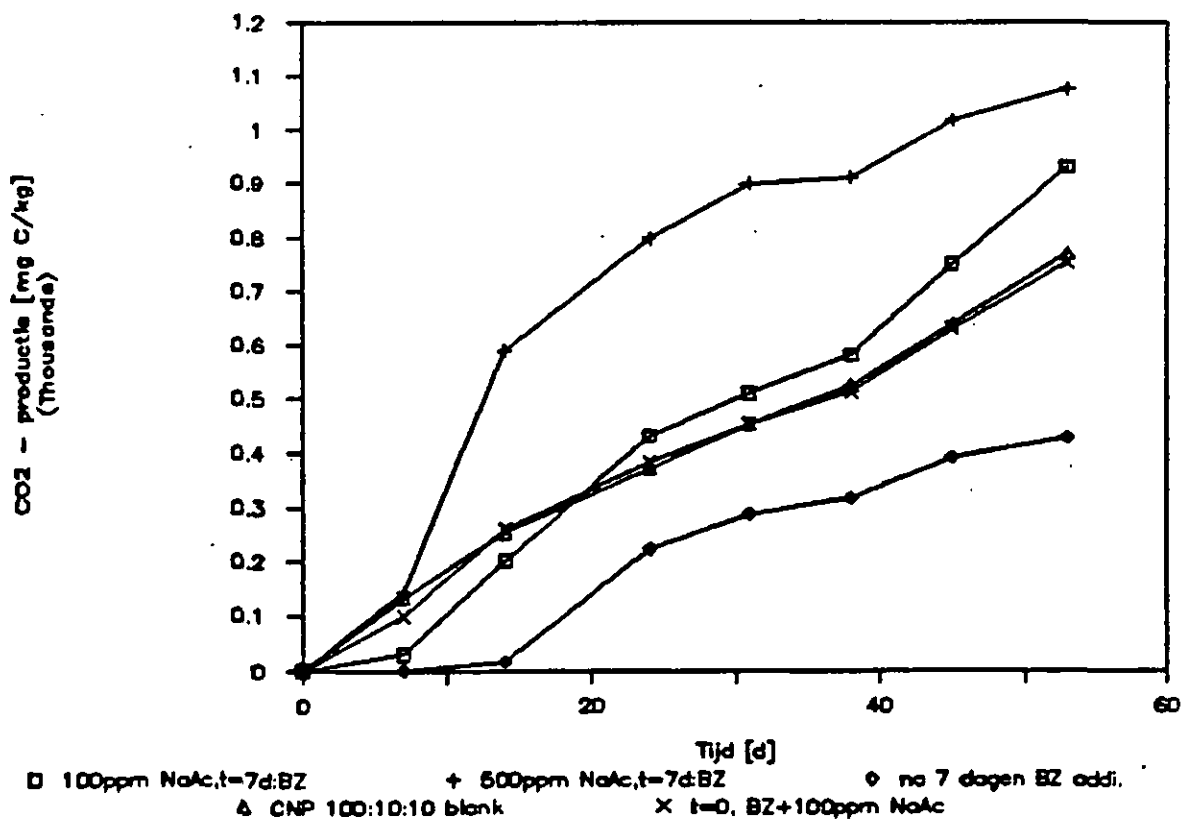
Figuur 28. Invloed van de fosfaatsdosering (C-P van geen fosfaat tot 100-50) op de benzine-afbraak, gemeten als de CO_2 productie [mg C/kg]. C-N verhouding 100-10. Concentratie benzine 2600 mg/kg.



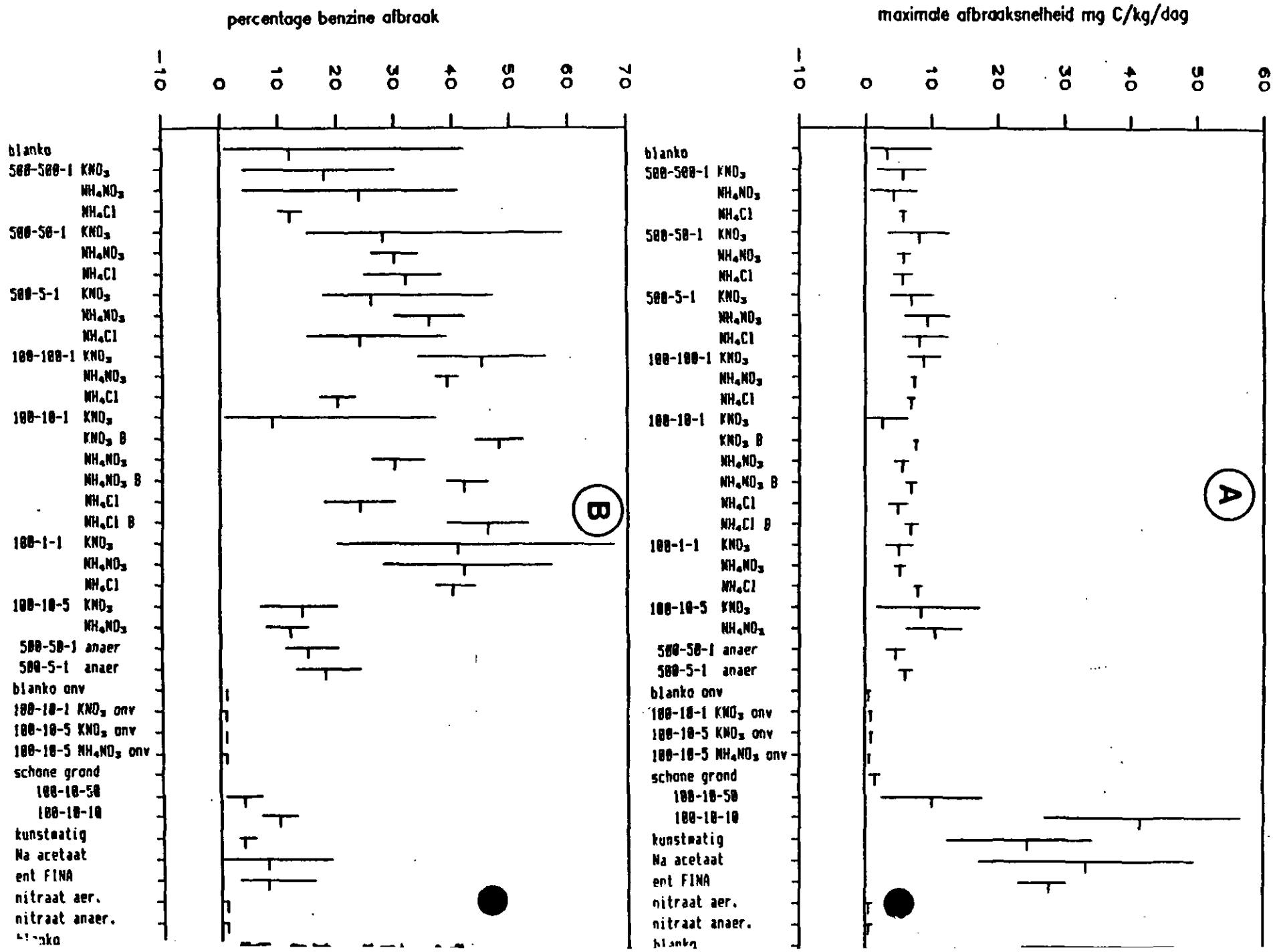
Figuur 29. Invloed van dosering van waterstofperoxide (25-200 mg H_2O_2 /kg) op de benzine-afbraak, gemeten als de CO_2 productie [mg C/kg]. $C-N-P$ verhouding 100-10-10. Concentratie benzine 2600 mg/kg. De waterstofperoxide is zowel op dag 0 als één week na incubatie toegevoegd.



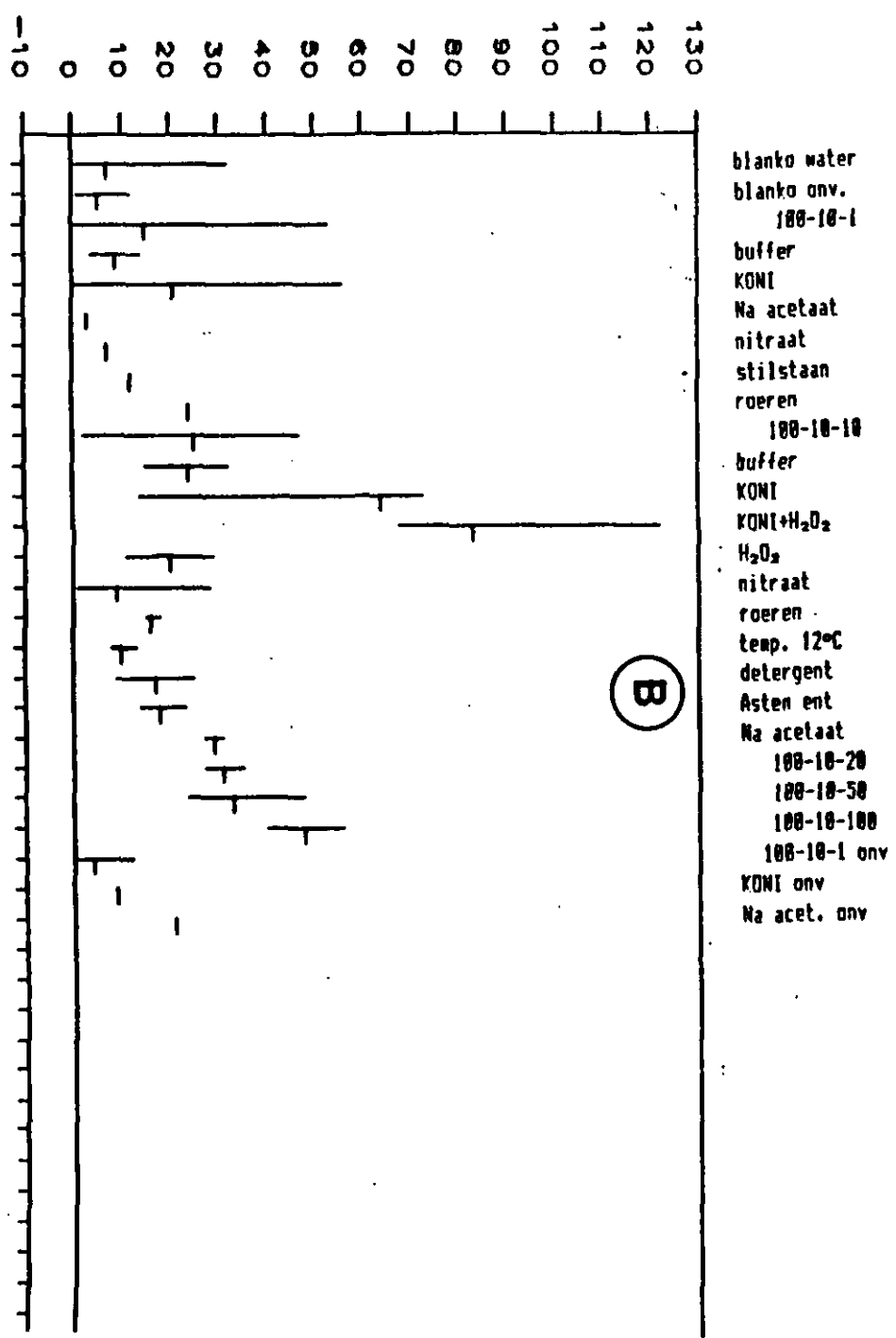
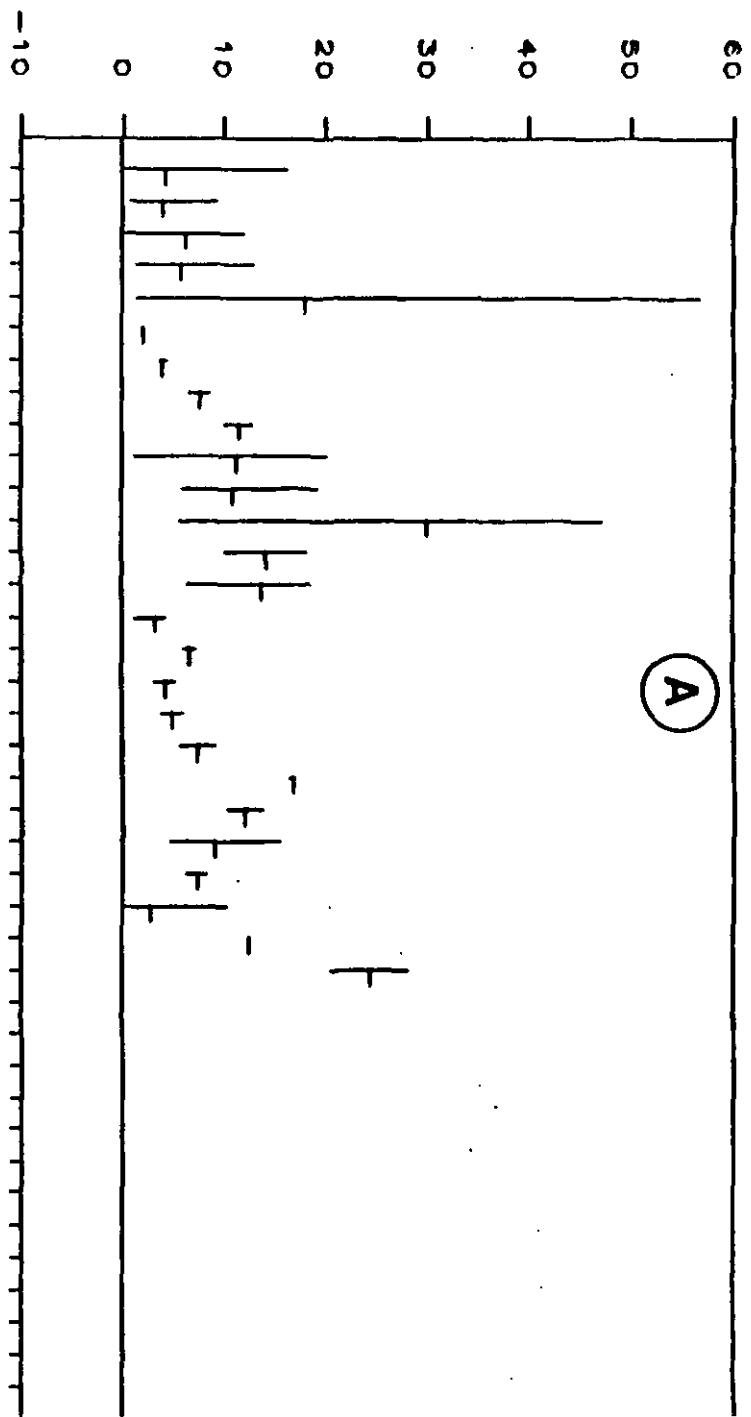
Figuur 30. Invloed van het toevoegen van natriumacetaat (0-500 mg/kg) op de benzine-afbraak, gemeten als de CO_2 productie [mg C/kg]. $C-N$ verhouding 100-10. Concentratie benzine 2600 mg/kg. Als alternatief is aan schone grond na één week incubatie met natriumacetaat benzine (2600 mg/kg) toegevoegd.



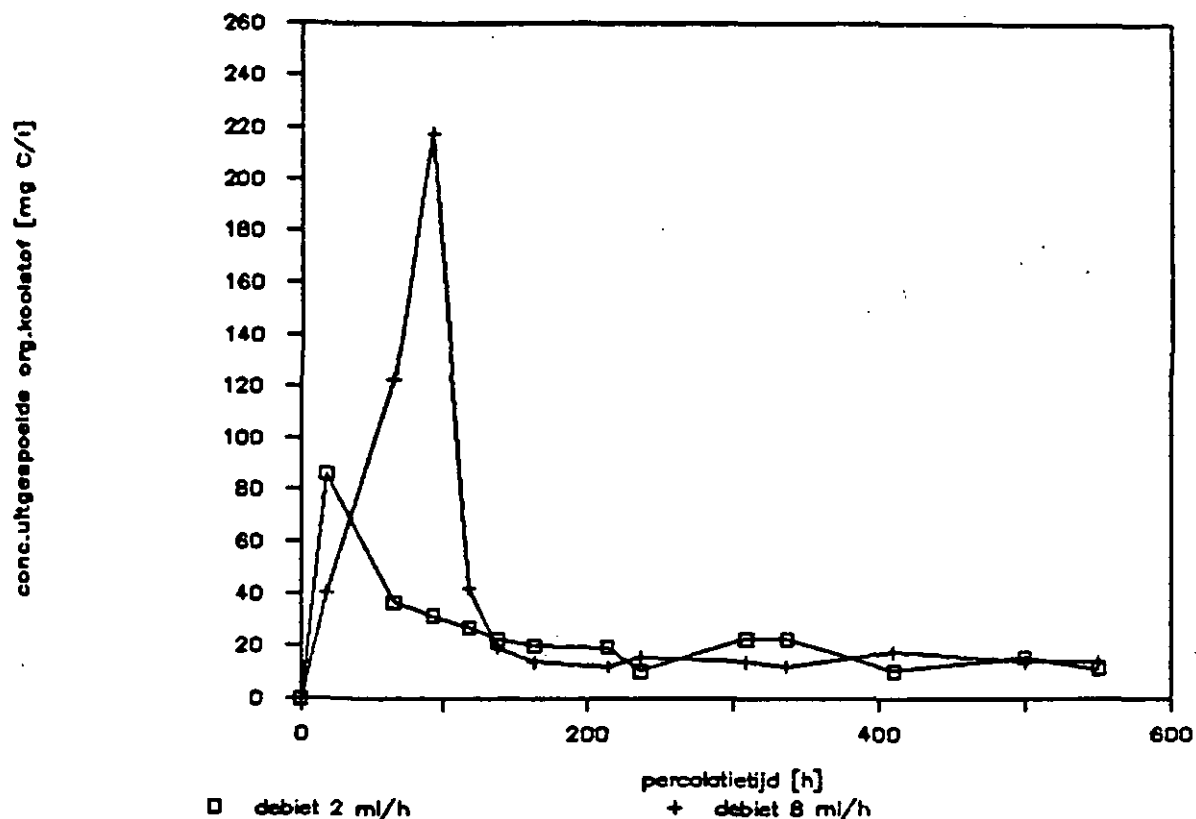
Figuur 31. Overzicht van de resultaten van het RIVM laboratorium afbraakonderzoek met benzine verontreinigde grond uit Asten, als functie van verschillende getoetste variabelen. Aangegeven is zowel A. de maximale afbraaksnelheid [mg C/kg/d] als B. het percentage afgebroken benzine.



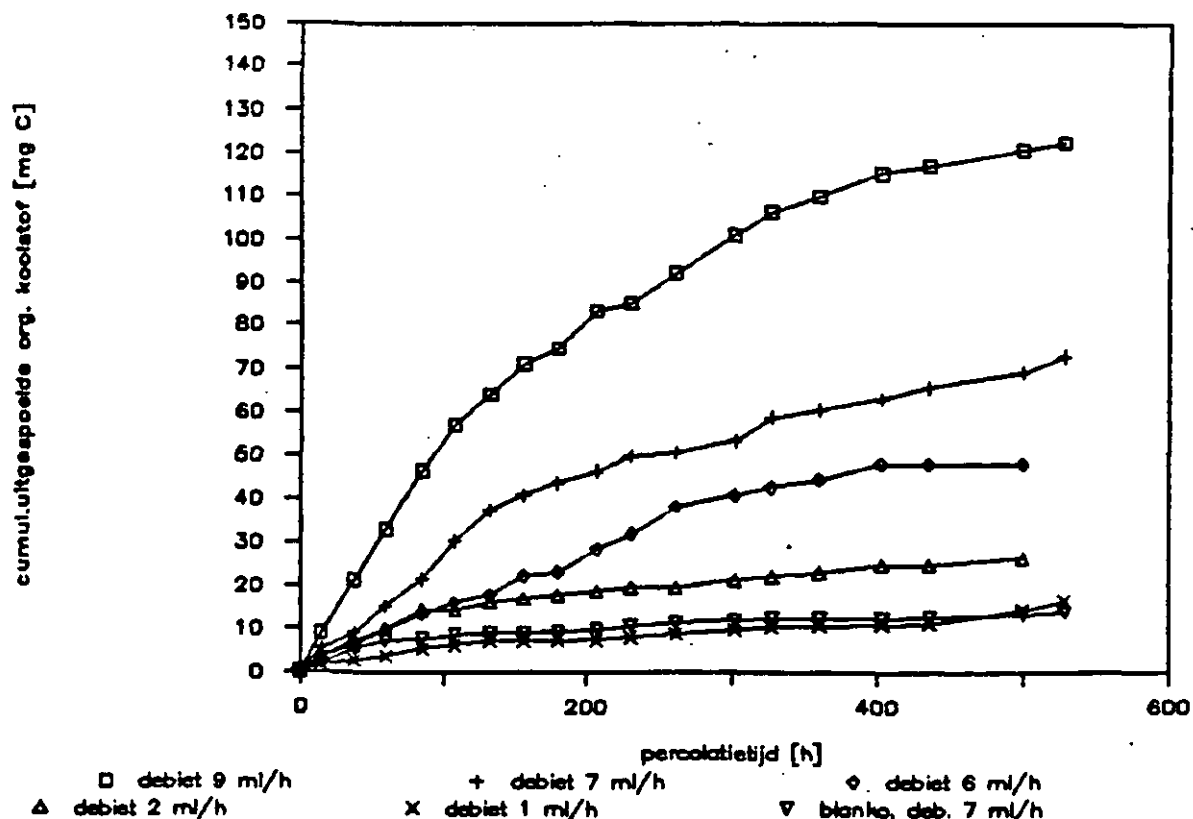
Figuur 32. Overzicht van de resultaten van het TNO laboratorium afbraakonderzoek met benzine verontreinigde grond uit Asten, als functie van verschillende getoetste variabelen. Aangegeven is zowel A. de maximale afbraaksnelheid [mg C/kg/d] als B. het percentage afgebroken benzine.



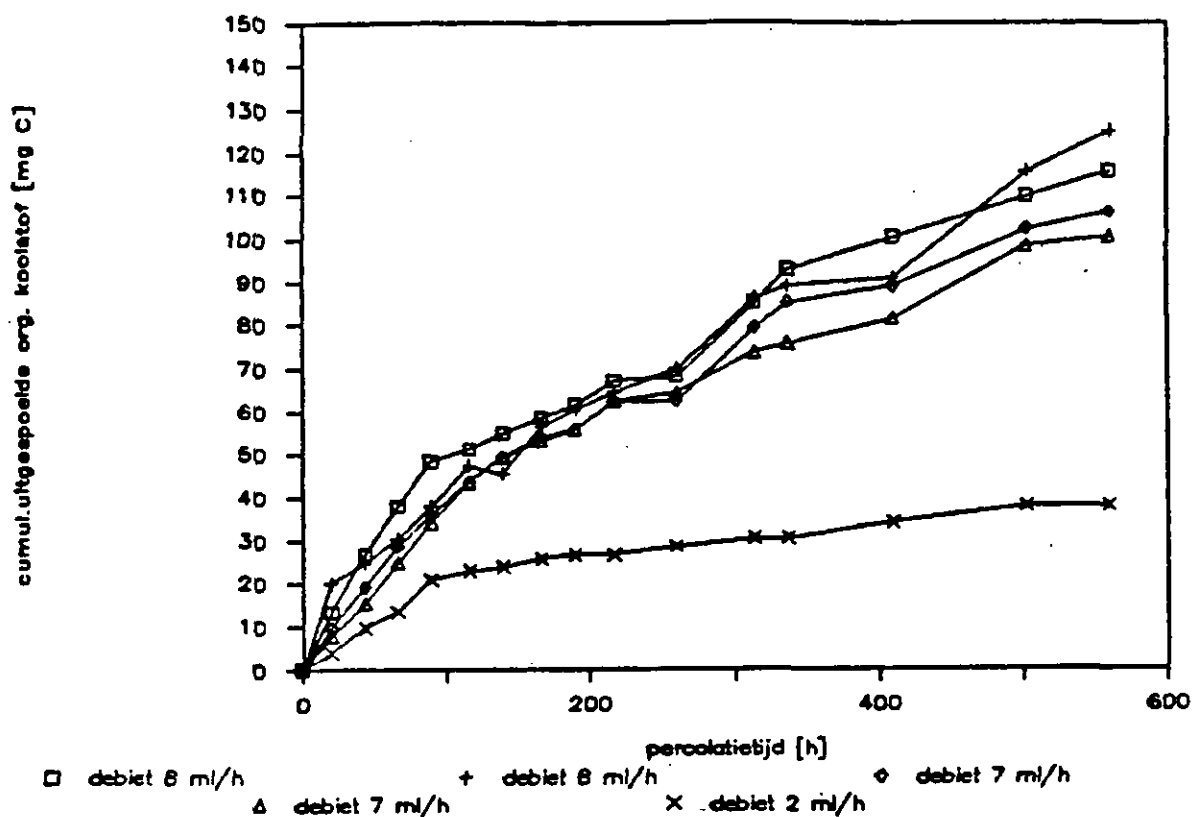
Figuur 33. Concentratie uitgespoelde organische koolstof [mg C/l] als functie van de percolatietijd [h] voor twee verschillende percolatiedebieten door een kolom met een 5 % porievolume restverzadiging benzine.



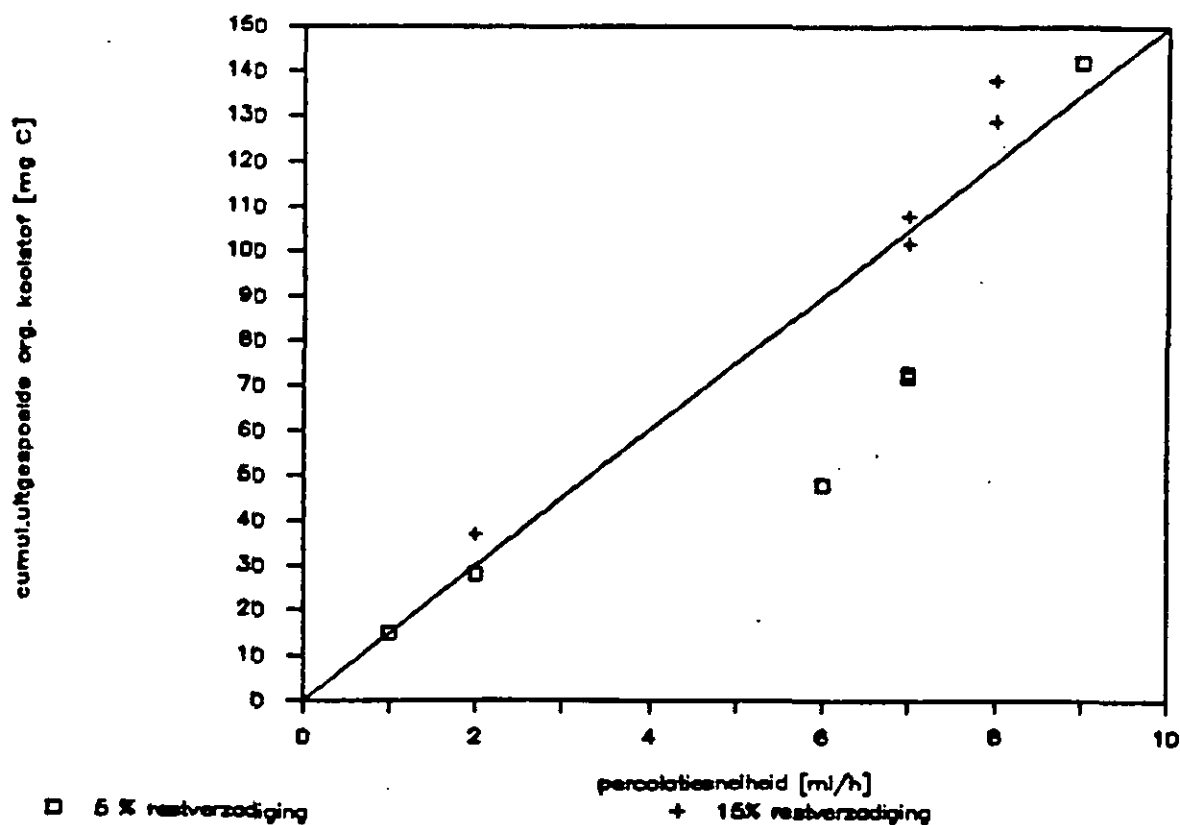
Figuur 34. Cumulatief uitgespoelde organische koolstof [mg C] als functie van de tijd [h] voor verschillende percolatiesnelheden [ml/h] door een kolom met een 5 % porievolume restverzadiging benzine.



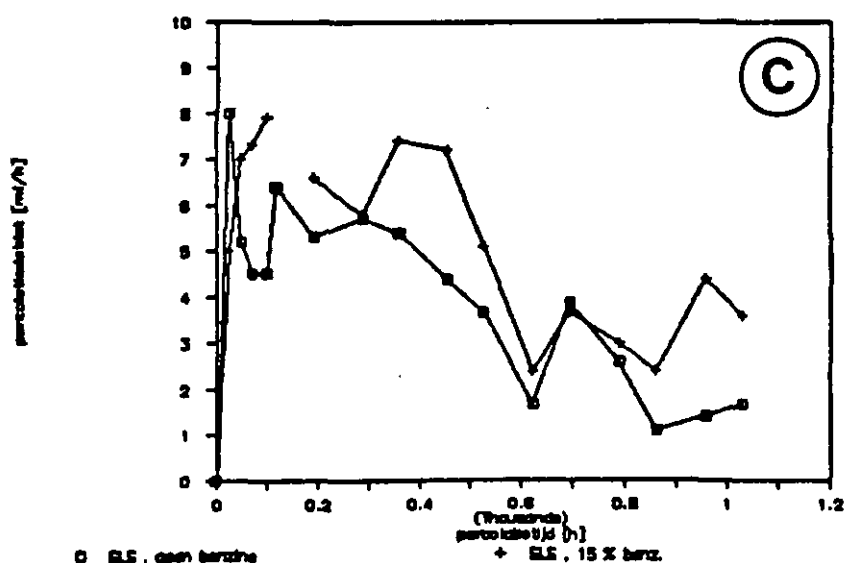
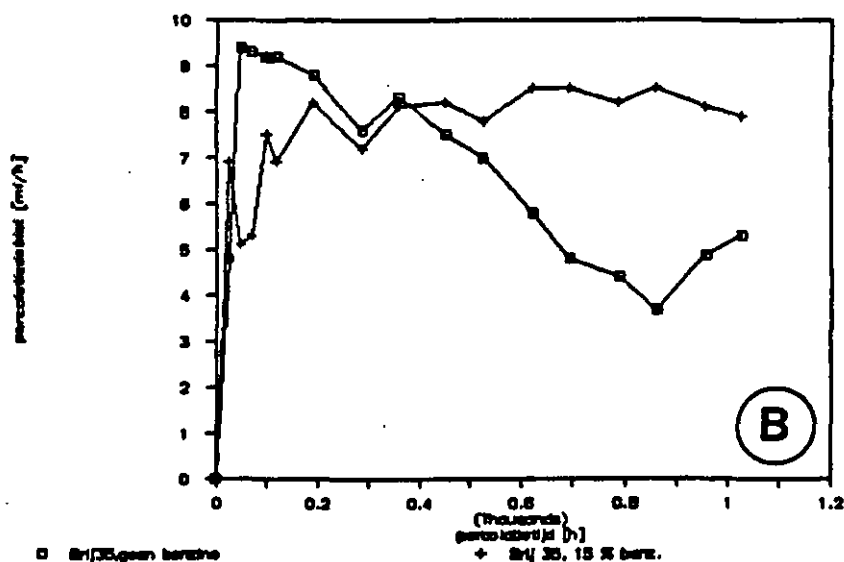
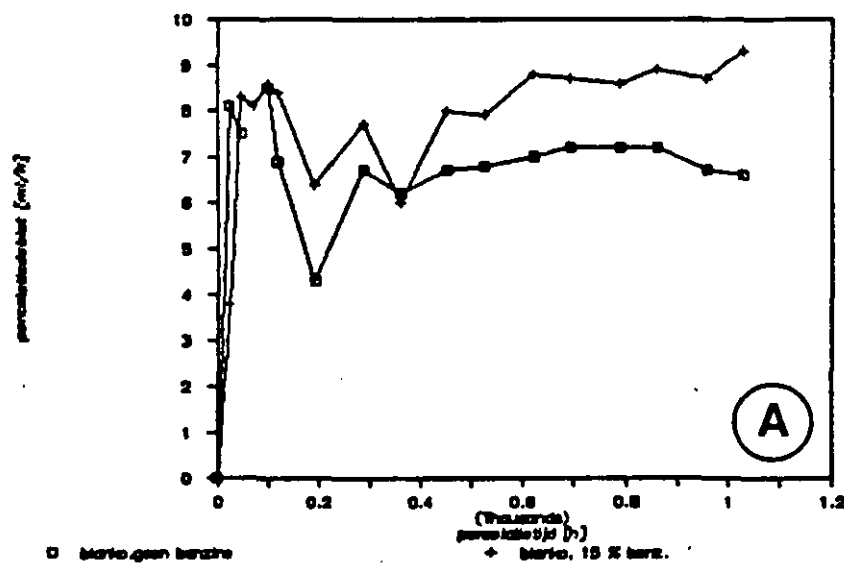
Figuur 35. Als figuur 33, maar met een 15 % porievolume restverzadiging benzine.

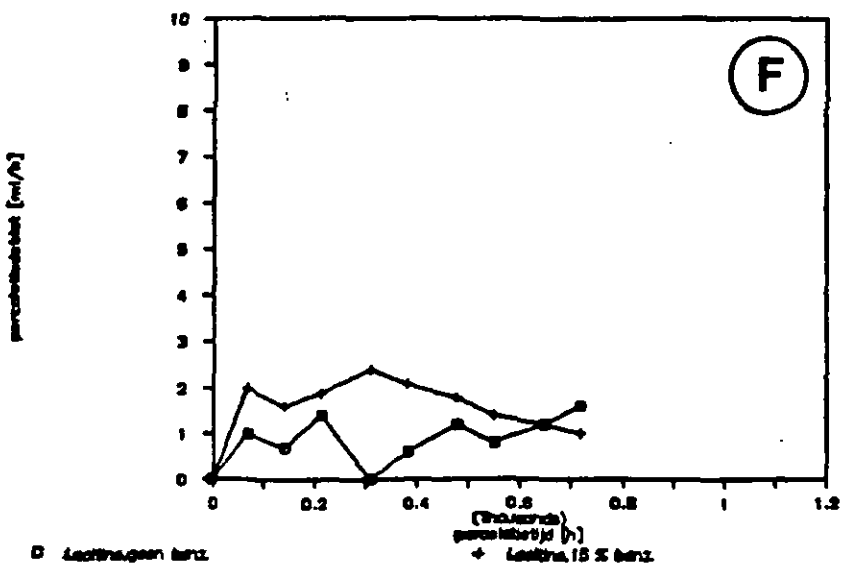
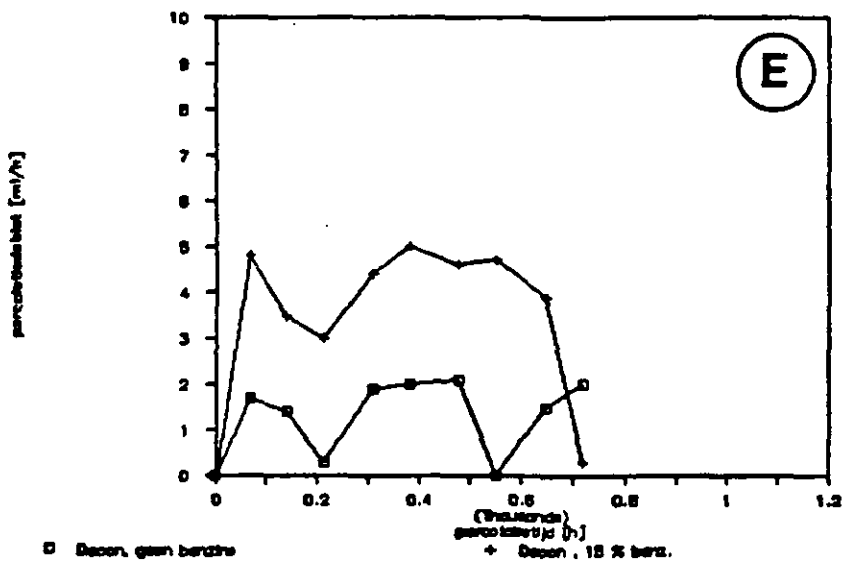
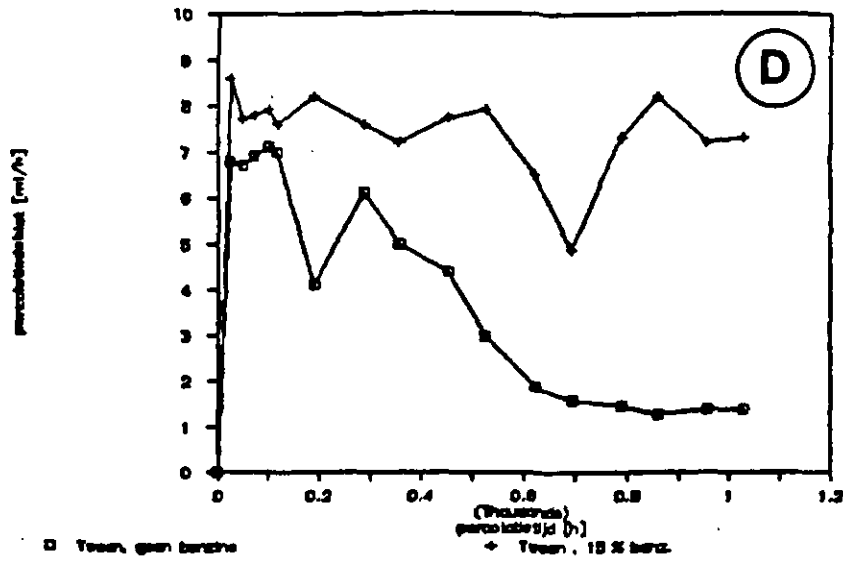


Figuur 36. Relatie, afgeleid uit de uitloogproeven, voor de cumulatief uitgespoelde organische koolstof na 500 uur percoleren [mg C] als functie van het percolatiedebiet [ml/h].

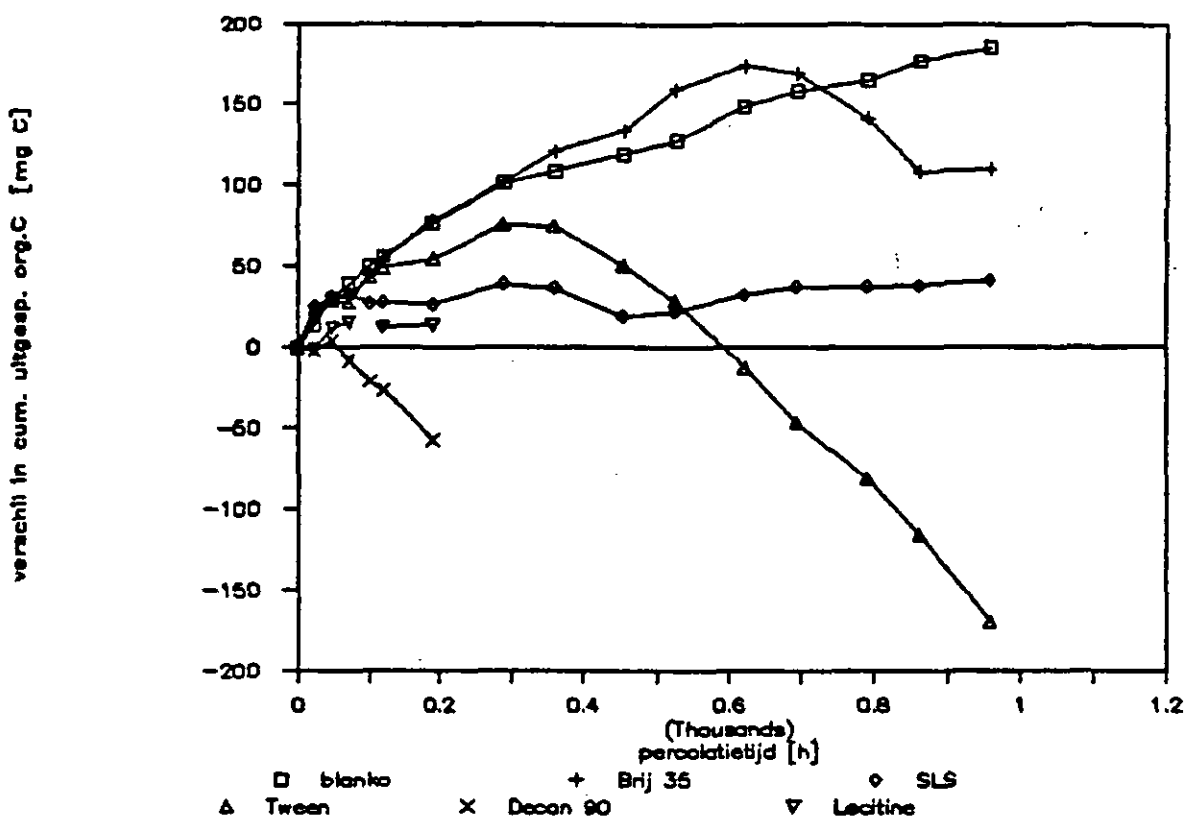


Figuur 37. Invloed van het toevoegen van detergenten aan het percolatiemedium (250 mg/l) op de percolatiesnelheid [ml/h] als functie van de percolatietijd [h] voor kolommen met Asten grond, waarin al dan niet een 15 % porievolume restverzadiging benzine is aangebracht. A. geen detergent, B. Brij 35, C. SLS, D. Tween, E. Decon, F. Lecithine.

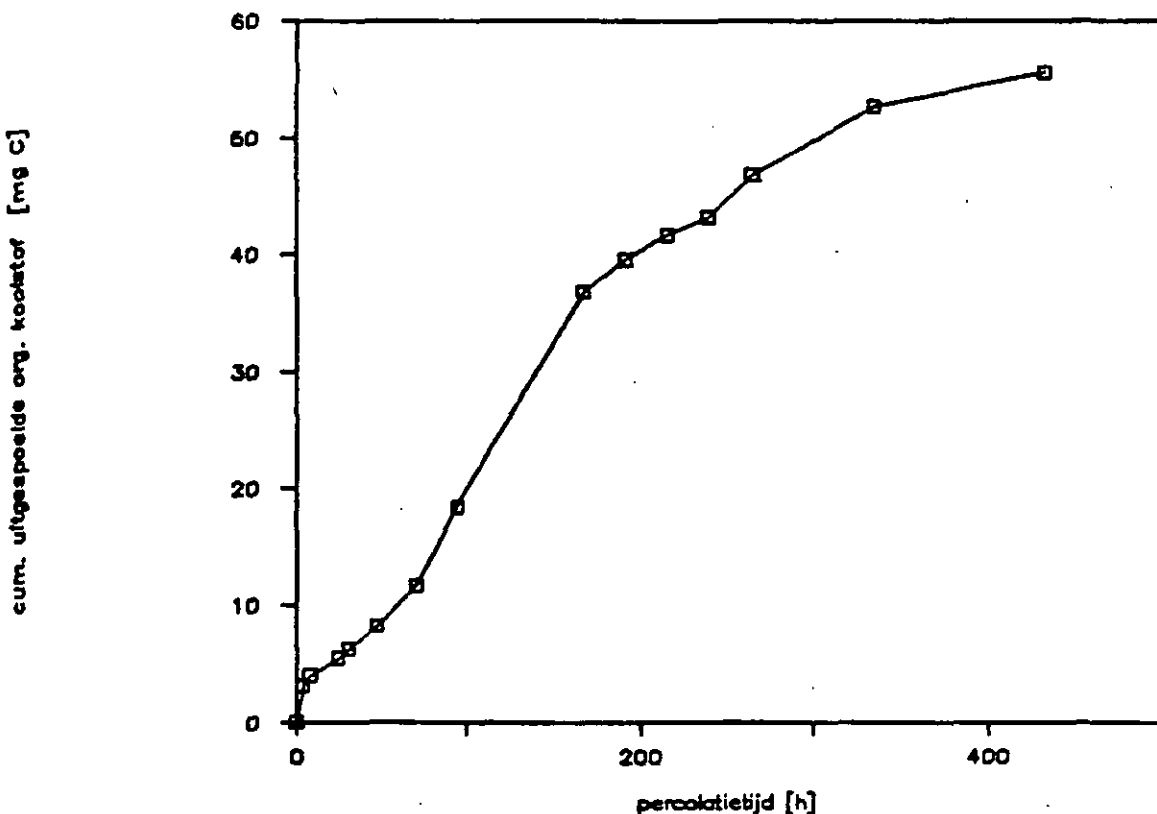




Figuur 38. Invloed van het toevoegen van detergenten aan het percolatiemedium (250 mg/l) op de cumulatief uitgespoelde hoeveelheid organische koolstof [mg C], berekend als het verschil in uitspoeling tussen een schone en een verontreinigde (15 % porievolume restverzadiging benzine) kolom grond.



Figuur 39. Cumulatief uitgespoelde hoeveelheid organische koolstof [mg C] als functie van de percolatietijd [h] voor een historisch verontreinigde kolom Asten grond (benzine 9300 mg C/kg), die gepercoleerd werd met een nutriëntenoplossing (C-N-P 100-10-10) bij een debiet van 6 ml/h.



Bijlage 1. Biodegradatietoetsen.

Biodegradatietoets met behulp van de Sapromat.

De Sapromat is een apparaat waarmee het zuurstofverbruik van een monster gemeten kan worden. Het meetsysteem bestaat uit een reactievat met daarin het monster, een zuurstofproductiebron en een drukmeter. Dit geheel vormt een gesloten systeem. De geproduceerde kooldioxide wordt geabsorbeerd door natronloog, dat in een vaatje in het meetvat aanwezig is. Door de consumptie van zuurstof ontstaat een onderdruk, welke door een drukmeter wordt gedetecteerd. De zuurstofproductiebron (electrolysevat met CuSO_4 oplossing) wordt ingeschakeld en produceert zuurstof. Vanwege de constante stroom door het electrolysevat is de electrolysetijd een maat voor de hoeveelheid geproduceerde en dus door het monster geconsumeerde zuurstof. Het verbruik wordt continu geregistreerd.

Voor de toepassing in het olie-afbraak-onderzoek werd 50 of 100 g veldvochtige (10 %) grond in het reactievat gedaan. Afhankelijk van het te onderzoeken effect werd vervolgens water met of zonder extra stoffen toegevoegd. Voor zover mogelijk werden de proeven in tweevoud uitgevoerd.

TNO Kooldioxideproductie Biodegradatietoets.

Een serumfles (300 ml) werd gevuld met 100 g veldvochtige grond. Aan deze grond werd afhankelijk van het onderzoek een nutriëntenoplossing toegevoegd. De flessen werden gasdicht afgesloten met een dop voorzien

van een septum met daaronder een teflon inlay om verdamping te voorkomen. De potten werden minstens in tweevoud ingezet en in het donker bij 20 °C schuddend of stilstaand geïncubeerd. Eenmaal per week werd de geproduceerde hoeveelheid kooldioxide bepaald door meting van het kooldioxidegehalte in de gasfase. Hiertoe werd met een injectiespuit 1 ml van de gasfase bemonsterd via het septum en het kooldioxide-gehalte gemeten met behulp van een infrarood-detector.

RIVM Kooldioxideproductie Biodegradatietoets.

De meting van de kooldioxideproductie werd uitgevoerd volgens Flowers e.a. (1984). Een glazen fles (580 ml) werd gevuld met 100 g veldvochtige grond. De grond werd verzadigd met een 50 ml oplossing van de gewenste stoffen in demiwater. Deze oplossing was vooraf doorgeborreld met kooldioxide vrije lucht. Het grond-water mengsel was dan juist een slurry. In de fles hing een houder met een vat met 20 ml 1 N NaOH. De potten werden afgesloten met een dop met teflon inlay om verdamping te voorkomen. De potten werden in drie- of viervoud ingezet en in het donker bij 20 °C schuddend (80 rpm) geïncubeerd.

De bij de afbraak geproduceerde kooldioxide werd ingevangen in de loogoplossing. Eenmaal per week werd de geproduceerde hoeveelheid kooldioxide gemeten door een titratie met 0.5 N HCl nadat eerst het gevormde carbonaat was neergeslagen met BaCl_2 .

Bij de meting van afbraak met onverzadigde grond was geen 50 ml oplossing toegevoegd, maar zonodig 1 ml van een geconcentreerde oplossing.

Bijlage 2. Uitloogexperimenten.

Voor de kolomexperimenten werden glazen kolommen gebruikt (Ø 3.9 cm, lengte 40 cm). Van beneden naar boven werden de kolommen gevuld met achtereenvolgens 2 cm glaspereels en kwartszand, 12 cm schoon Asten zand, 12 cm zand waar, afhankelijk van de proefopzet, benzine doorheen was gemengd, 12 cm schoon zand en weer 2 cm glaspereels met kwartszand. Voor verontreinigingen van 5 respectievelijk 15 % porienvolume aan benzine werd 2,1 resp. 6,3 g benzine aan 250 g zand toegevoegd. Als percolatiemedium werd een oplossing gemaakt van 6 g NaCl, 21 mg KNO_3 , 3 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en eventueel 250 mg detergent in 1 liter gedimineriseerd water. De kolommen werden van onderaf verzadigd met het percolatiemedium tot net onder de verontreinigde laag. Op ditzelfde niveau werd een grondwaterstand aangelegd. Vervolgens werden de kolommen van bovenaf gepercoleerd. Het effluent werd in flessen opgevangen bij 5 °C om verdere reacties tegen te gaan. De monsterfrequentie varieerde van eens per dag in het begin tot later twee keer per week. Bij de monsternamen werd ook het volume van het effluent gemeten ter controle van het debiet.

Na afloop van de experimenten werd de vaste fase van de kolommen geanalyseerd op het gehalte aan benzine. Daartoe werden de kolommen in lagen verdeeld en de monsters in een goed afgesloten pot gedaan, afgedekt met Al-folie en bij -20 °C bewaard tot bewerking en analyse.

Bijlage 3. Analysemethoden.

Bepaling opgelost organisch koolstof (DOC).

Het DOC gehalte van oplossingen werd bepaald met behulp van de Dohrman DC-80 Carbon Analyzer. In een reactievat werden de organische verbindingen in een oplossing van kaliumpersulfaat en fosforzuur onder invloed van UV-straling geoxideerd tot kooldioxide. De vrijgekomen kooldioxide werd gemeten met een infrarood detector. Met behulp van een ijklijn werd het DOC gehalte bepaald. De monsters werden voorbehandeld door 1 ml vloeistof gedurende 10 minuten bij 5000 rpm te centrifugeren. Het supernatant werd aangezuurd met 4 N HCl en doorgeblazen met argon om anorganisch koolstof te verwijderen. De monsters werden vervolgens tot de analyse bij -20 °C bewaard.

Nitraat en nitriet bepaling.

De nitraat- en nitrietgehalten werden bepaald met behulp van een auto-analyzer. Nitraat werd gereduceerd tot nitriet door de oplossing over een koper/cadmium kolom te leiden. Nitriet reageerde vervolgens met sulfanilzuur tot een diazoverbinding, welke in de volgende stap met N-1-naphtylethyleendiaminedihydrochloride een paars gekleurde verbinding vormde. In een colorimeter werd de absorptie gemeten en met behulp van een ijklijn kon het nitriet- of nitraat gehalte berekend worden.

Analyse van olie in grondmonsters.

Natte grond (30 à 40 g) werd gedurende 16 uur geëxtraheerd in een soxhletapparaat met zwavelkoolstof. Het CS_2 -extract werd aangevuld tot 50 ml. Na het uitdampen van de CS_2 werden de grondmonsters gedurende 1 uur gedroogd bij 104 °C en vervolgens teruggewogen voor bepaling van de in behandeling genomen hoeveelheid droge stof.

Het zwavelkoolstofextract werd gaschromatografisch geanalyseerd. Hierbij werd gebruik gemaakt van een apolaire kolom en een vlamionisatie detector. Identificatie van de pieken vond plaats op basis van retentietijden in vergelijking met standaardoplossingen. De kwantificering werd uitgevoerd met externe standaarden. De chromatogrammen werden opgeslagen in een datasysteem.

Analyse van olie in watermonsters.

Het watermonster werd geëxtraheerd in de verhouding 100:2 met pentaan. Het mengsel werd na 5 minuten schudden teruggeplaatst in de koelkast (4 °C). Dit schudden werd tenminste driemaal herhaald met tussenpozen van tenminste een half uur. Het extract werd in een 2 ml vial gebracht en opgeslagen bij -20 °C tot de analyse.

Het monster werd split geïnjecteerd op een capillaire kolom met een relatief dikke apolaire coating. Scheiding vond plaats met een temperatuurprogramma van 60 minuten. Het signaal afkomstig van de vlamionisatiedetector werd geregistreerd met het Nelson 3000 systeem.

De kwantificering werd uitgevoerd op basis van een externe standaard (TNO standaard 1008 met 20 componenten in CS_2). Piekerkenning werd

uitgevoerd met behulp van de relatieve retentietijd ten opzichte van n-undecaan. Door de wisselende retentietijden voor C9 (solvent effect) was automatische piekherkenning problematisch.

Gaschromatografische condities:

kolom: CP Sil 5 CB (Chrompack), 25 m lang, I.d. 0.34 mm, df 1.3 μ m.

temperatuurprogramma: (2 min) 25 °C -- 4 °C/min --> 260 °C.

detectortemperatuur: 300 °C, injectortemperatuur: 250 °C.

draaggas: waterstof 3 ml.min⁻¹.

injectievolume: 2 μ l mbv een Varian series 8000 automaat.