

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE  
BILTHOVEN

Rapport 728603004

GEDRAG VAN CHLOORFENOLEN IN DE BODEM  
Resultaten van het biodegradatieonderzoek

R. van den Berg

maart 1989

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

VERZENDLIJST

- 1 - 3 Hoofd van de Hoofdafdeling Bodem van het Directoraat-Generaal  
Milieubeheer, Directie Drinkwater, Water en Bodem
- 4 Directie RIVM
- 5 Dr.Ir.T.Schneider
- 6 Ir.N.D.van Egmond
- 7 Ir.W.Cramer
- 8 Dr.Ir.C.van den Akker
- 9 Projectcoördinator DGM/DWB/Bo Dr.J.Willems
- 10 Projectleider Dr.Ir.J.P.G.Loch
- 11 Auteur
- 12 - 18 Leden van de projectgroep
- 19 - 37 Medewerkers LBG
- 38 - 39 LBG/SGO
- 40 - 41 Bureau Rapporten- en projectenregistratie
- 42 - 72 Réserve

VERZENDLIJST

- 1 - 3 Hoofd van de Hoofdafdeling Bodem van het Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Drinkwater, Water en Bodem.
- 4 Secretaris-Generaal van het Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur.
- 5 Directeur-Generaal Milieubeheer van het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.
- 6 Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer van het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.
- 7 Directie RIVM.
- 8 Dr. Ir. T. Schneider.
- 9 Ir. N.D. van Egmond.
- 10 Ir. W. Cramer.
- 11 Dr. Ir. C. van den Akker.
- 12 Projectcoördinator DGM/DWB/Bo Dr. J. Willems.
- 13 Projectleider Dr. Ir. J.P.G. Loch
- 14 Auteur.
- 15-21 Leden van de projectgroep.
- 22-40 Medewerkers LBG.
- 41-42 LBG/SGO.
- 43-44 Bureau Rapporten- en projectenregistratie.
- 45-75 Reserve.

## INHOUDSOPGAVE

	blz.
Verzendlijst	ii
Inhoudsopgave	iii
Summary	iv
Samenvatting	v
1 Inleiding	1
1.1 Algemeen	1
1.2 Probleemstelling	1
1.3 Literatuur	2
2 Materiaal en methoden	8
2.1 Grondsoorten	8
2.2 Chloorfenolen	8
2.3 Biodegradatie-experimenten	9
2.3.1 Het eerste biodegradatie-experiment	10
2.3.2 Het tweede biodegradatie-experiment	11
2.4 Analysemethode chloorfenolen	12
2.5 Afbraakkinetiek	12
2.6 Statistische analyse van de resultaten	14
3 Resultaten en discussie	18
3.1 Incubatieomstandigheden	18
3.1.1 Mate van (an)aerobie	18
3.1.2 Mineralisatie	18
3.1.3 Steriliteit	20
3.1.4 Vervluchtiging	20
3.2 Omzetting van chloorfenolen	21
3.2.1 Gebonden residu en chemische afbraak	21
3.2.2 Microbiologische afbraak	28
3.2.3 Omzettingspercentages	28
3.2.4 Afbraakkinetiek	30
3.2.5 Lagfasen	31
3.2.6 Halfwaardetijden	32
4 Conclusies en aanbevelingen	38
Literatuurreferenties	41
Bijlagen 1 t/m 6	45

## SUMMARY

In two experiments the degradation has been studied of a number of chlorophenol congeners, differing in the number of chlorine atoms, in four soils with differences in acidity and organic matter content. The degradation has been studied for topsoil material and under aerobic as well as anaerobic, or rather microaerophilic conditions.

The experiments offered information about (micro)biological and chemical degradation as well as the formation of bound residues.

Bound residue formation, defined by the unextractable part with the applied extraction method, appeared to occur immediately within the first few hours, but not during the incubation. Poor recoveries were determined for 4-chlorophenol, pentachlorophenol and 3-chlorophenol. Bound residue formation hardly occurred for the 3,4-di-, 2,4,5-tri and 2,3,4,6-tetrachlorophenol. Considering the soil type the recovery decreased in the order Duinzand (DZ, dune sand) > Podzolsoil (PZ) >> Eerdsoil (EG) > Zeeklei (ZK, marine clay). A direct relation between bound residue formation and soil and chlorophenol parameters has not been found.

Volatilization and chemical transformation did not occur.

All tested chlorophenols were degraded (micro)biologically. Only primary degradation, not mineralization, could be determined.

The degradation process was described best by first order kinetics.

The degradation percentages after 77 days of incubation varied from 40 to 100 percent and decreased considering soil type in the order DZ, ZK, PZ, EG. The aerobic degradation was higher than or equal to the anaerobic degradation. Complete primary degradation during the incubation of 77 days was observed only for 3- and 4-chlorophenol and under aerobic conditions for 3,4-dichlorophenol, but only occasionally for the other chlorophenols and the degradation percentage appeared to decrease with increasing chlorination.

By analyzing the degradation in the lagphase and the phase of degradation lagphases of upto 20 days were calculated. Some indications were found for a relation to the initial number of degrading microorganisms.

The half-lives calculated for the two experiments varied from 1 to 103 days. Generally, the half-lives were longer under microaerophilic conditions than aerobically, although the differences were not significant except for a few cases.

With the exception of the dune sand (DZ) in the soil types the trend was observed of a longer half-life with an increase in the number of chlorine atoms. Considering the soil type an increase in half-life was observed with an increase in organic matter content. This could indicate that desorption is the rate limiting step for degradation.

It is concluded that a reliable prediction based on soil and substance parameters is not yet possible because the mechanisms are not yet understood.

Further research, especially for the degradation products is necessary.

## SAMENVATTING.

In een tweetal experimenten is de omzetting van een aantal chloorfenolcongeneren, verschillend in het aantal chloorsubstituenten, in een viertal bodemtypen, met verschillende zuurgraad en organisch stofgehalte, onderzocht. De afbraak is onderzocht voor bovengrondmateriaal en zowel voor aerobe, als anaerobe of lieverzuurstofarme incubatie.

Uit de experimenten werd informatie over zowel (micro)biologische als chemische omzetting en gebonden residuvorming verkregen.

Gebonden residuvorming, gedefinieerd als het met de toegepaste extractiemethode niet extraheerbare deel, bleek alleen instantaan op te treden, maar niet gedurende de incubatie. Slechte recovery's en dus sterke gebonden residuvorming werden vastgesteld voor 4-chloorfenol (recovery 26-100 %), pentachloorfenol (recovery 17-100 %) en 3-chloorfenol (recovery 29-100 %). Gebonden residuvorming trad niet of nauwelijks op bij 3,4-di-, 2,4,5-tri- en 2,3,4,6-tetrachloorfenol. Wat betreft het bodemtype nam de recovery af in de volgorde duinzand (DZ) > podzol (PZ) >> eerdgrond (EG) >= zeelei (ZK). Een directe relatie met organisch stofgehalte, bodem-pH,  $pK_a$  en  $K_{ow}$  van de stof kon niet worden vastgesteld.

Vervluchtiging en chemische omzetting bleken niet op te treden.

Alle getoetste chloorfenolen werden microbiologisch omgezet. Op basis van de metingen kon alleen primaire omzetting worden vastgesteld, geen mineralisatie.

Het omzettingsproces kan het beste met behulp van eerste orde kinetiek worden beschreven.

De omzettingspercentages varieerden van 40-100 procent en namen wat betreft bodemtype af in de volgorde DZ, ZK, PZ, EG. De omzetting onder aerobe omstandigheden was in het algemeen hoger dan of gelijk aan die onder zuurstofarme omstandigheden. De omzetting was binnen de toetsduur van maximaal 77 dagen in het algemeen volledig voor 3- en 4-chloorfenol en aerob voor dichloorfenol, maar slechts incidenteel voor de andere chloorfenolen en lijkt af te nemen met de mate van chlorering.

Bij de analyse van de omzetting in lagfase en fase van omzetting werden maximale lagfasen van ongeveer 20 dagen geconstateerd.

De berekende halfwaardetijden varieerden over de twee experimenten samen van 1 tot 103 dagen. In het algemeen bleken de halfwaardetijden zuurstofarm langer dan aerob met slechts incidenteel een aanwijzing voor een significant verschil.

Met uitzondering van duinzand werd in de bodemtypen de trend waargenomen van een langere halfwaardetijd met toenemende mate van chlorering. Wat betreft het bodemtype werd een toename van de halfwaardetijd met toenemend organisch stofgehalte geconstateerd. Dit zou kunnen wijzen op desorptie als snelheidsbeperkende stap voor omzetting.

Gesteld kan worden dat nog geen betrouwbare voorspelling van het gedrag op basis van stof- en bodemparameters mogelijk is omdat de mechanismen achter de omzetting nog niet bekend zijn.

Nader onderzoek, met name naar de omzettingsproducten is noodzakelijk.

## 1 INLEIDING

### 1.1 Algemeen.

In opdracht van de Hoofdafdeling Drinkwater, Water en Bodem van het Directoraat-Generaal Milieubeheer (VROM) wordt door het RIVM het project "Onderzoek naar het gedrag van chloorfenolen in de bodem" (projectnr. 728603) uitgevoerd. Het doel van het project is als volgt geformuleerd: het verkrijgen van inzicht in het gedrag van gechloreerde fenolen in bodem en grondwater, teneinde het gevaar voor bodemverontreiniging o.a. in gronden met variërende kalkgehalten en gehalten aan organische stof te kunnen beoordelen.

Het project is verdeeld in de volgende deelprojecten:

- \* Onderzoek naar de sorptie van chloorfenolen
- \* Onderzoek naar de bio-afbreekbaarheid van chloorfenolen
- \* Modelleren van het gedrag van chloorfenolen
- \* Bestudering van het gedrag van chloorfenolen in laboratoriumkolommen met een zestal Nederlandse grondsoorten.

Eveneens is onderzoek gedaan naar de invloed van de chloorfenolen op de nematodenpopulatie in de grond (Kappers en Wondergem, 1988) en toxiciteit en bioaccumulatie in regenwormen (Van Gestel et al., 1987).

Dit rapport omvat de resultaten van het biodegradatieonderzoek dat uitgevoerd is door P.C. Deul (1987) en welke zijn vastgelegd in RIVM rapportnr. 728603002 "Mobiliteit en afbreekbaarheid van chloorfenolen in grond".

### 1.2 Probleemstelling.

In verband met de lozingen in het milieu van gevaarlijke en/of toxische stoffen door de lidstaten, heeft de EG een lijst met 129 "priority pollutants" opgesteld (Dekker, 1983). Tot de "priority pollutants" behoren de volgende chloorfenolen: pentachloorfenol, trichloorfenolen, 2,4-dichloorfenol, 2-amino-4-dichloorfenol, 4-chloor-3-methylfenol en de drie monochloorfenolen.

Chloorfenolen kunnen in het milieu terecht komen als gevolg van het gebruik als houtconserveringsmiddel en als bestrijdingsmiddel; bovendien

kunnen het afbraakproducten zijn van verschillende pesticiden (o.a. chloorfenoxycarbonzuren) en zijn het bijproducten bij sommige organische syntheses. In Nederland zijn chloorfenolen aangetoond in oppérvlaktewater (Wegman en Hofstee, 1979) en in sediment (Wegman en van den Broek, 1983).

Uit publicaties van o.a. Matthes (1984) en Schwarzenbach en Westall (1983) blijkt dat leemten bestaan in de kennis van de processen die chloorfenolen in de bodem ondergaan.

Hét gedrag van chloorfenolen in de bodem, na immissie, wordt vastgelegd als resultante van een aantal processen in de bodem: fysisch-chemische (uitspoeling, vervluchtiging, reversibele sorptie, gebonden residu vorming, chemische omzetting) en biologische (omzetting door microorganismen) processen. Voor een definitieve eliminatie van chloorfenolen uit de bodem zijn de omzettingsprocessen van belang. Gebonden residu vorming en reversibele sorptie leiden tot tijdelijke of permanente belasting van de bodem en beïnvloeden mogelijk de multifunctionaliteit, terwijl uitspoeling juist een bedreiging voor het grondwater vormt.

Verschillende factoren kunnen deze processen beïnvloeden, bijvoorbeeld de fractie organische stof en de zuurgraad (pH) van de betreffende grondsoort. Boven een bepaalde pH komen de chloorfenolen voor in de fenolaatvorm, een negatief geladen ion dat minder snel interacties aangaat met het bodemmateriaal. Met name in gronden met een hoge pH zou daarom bodemverontreiniging als gevolg van uitspoeling naar het grondwater mogelijk zijn.

Dit rapport beschrijft de resultaten van het biodegradatieonderzoek.

Doel van het onderzoek was vast te stellen of en in welke mate microbiologische afbraak van chloorfenolen plaatsvindt. Daarnaast is geprobeerd om enkele afbraakparameters te kwantificeren, in relatie met de gebruikte grondsoorten.

### 1.3 Literatuur.

De literatuur over de omzetting van chloorfenolen geeft twee belangrijke processen hiervoor aan: fotolyse en microbiologische afbraak. Chemische afbraak treedt meestal in relatief verwaarloosbare mate op ten opzichte



van biodegradatie. Vervluchtiging is in het algemeen ook verwaarloosbaar (Murthy et al., 1979; Valo en Salkinoja-Salonen, 1986; Baker en Mayfield, 1980; Scheunert et al., 1986).

De literatuur over de biologische afbraak van de chloorfenolcongeneren heeft met name betrekking op pentachloorfenol en voorts op de van de bestrijdingsmiddelen 2,4-D (2,4-dichloorfenoxyazijnzuur) en 2,4,5-T (2,4,5-trichloorfenoxyazijnzuur) afgeleide chloorfenolen.

Bij dit onderzoek heeft met name de biodegradatie in de verontreinigde situaties aandacht gekregen. Dit heeft als gevolg dat vooral de verwijdering van hoge concentraties van deze stoffen onderzocht is, waarbij ook getracht is micro-organismen te isoleren en karakteriseren. Als aerobe chloorfenol afbrekende reine isolaten zijn gevonden: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Flavobacterium* en een saprofyte coryneform (Keuning en Janssen, 1987). Als pentachloorfenolafbrekers zijn tevens diverse fungi geïsoleerd. Anaeroob zijn nog geen reïncultures verkregen.

Veel van het onderzoek naar de omzetting van chloorfenolcongeneren is uitgevoerd als afgeleide van het onderzoek aan reine en gemengde cultures, die één bepaalde chloorfenol konden afbreken. Omzetting, zowel aerob als anaerob, is voor (vrijwel) alle chloorfenolen aangetoond. Mineralisatie en/of gebruik als bron van koolstof en energie is voor een beperkte groep congeneren beschreven. Aerobe en anaerobe mineralisatie is beschreven voor de monochloorfenolen, 2,4-dichloorfenol en pentachloorfenol en alleen aerob voor 2,4,5-trichloorfenol.

De mechanismen voor aerobe omzetting van de chloorfenolen zijn gezien de activiteit ten opzichte van de verschillende congeneren en de omzettingsproducten zeker niet altijd hetzelfde. Apajalahti en Salkinoja-Salonen (1986) vonden bij *Rhodococcus chlorophenolicus* een preferentie voor hoog gechlloreerde fenolen en een verminderde omzetting van dichloorfenolen, terwijl Karns et al. (1983) eenzelfde efficiency van omzetting voor di-, tri-, tetra- en pentachloorfenolcongeneren waarnamen bij *Pseudomonas cepacia*. Waarschijnlijk is ook sprake van verschillende mechanismen voor enerzijds tetra- en pentachloorfenolen en anderzijds de lager gechlloreerde fenolen (Karns et al., 1983). Bij lager gechlloreerde fenolen is in het algemeen de trend aanwezig dat

substitutie op de meta-plaats tot een tragere omzetting leidt (Baker en Mayfield, 1980) en Karns et al. (1983) wezen op een vertraagde omzetting als twee substituenten op dezelfde positie ten opzichte van de hydroxygroep zaten.

Anaeroob is nog te weinig onderzoek gedaan naar omzetting van series van congenere om eenduidige conclusies te kunnen trekken. Mikesell en Boyd (1985) en Boyd en Shelton (1984) concludeerden dat de chloorsubstituent(en) op de ortho-positie(s) preferent verwijderd worden.

Als omzettingsproducten van de chloorfenolen zijn vooral anisolen (door O-methylering, een reversibele reactie en waarschijnlijk een ontgiftingsmechanisme), catecholen (hydroxygroepen ortho t.o.v. elkaar) en hydrochinonen (hydroxygroepen para t.o.v. elkaar) (door hydroxylering of hydrolytische dechlorering) en lager gesubstitueerde congenere (door reductieve dechlorering) aangetoond. Daarnaast moet voor uiteindelijke mineralisatie natuurlijk ringopening optreden. Deze kan optreden als twee hydroxygroepen aanwezig zijn aan de ring. Meest bekend is de ringopening van catecholen door meta- of orthosplitsing.

Omzetting van chloorfenolen in de bodem is met name voor pentachloorfenol onderzocht (Engelhardt et al., 1986). Algemeen werd gesteld dat de afbraak anaeroob sneller zou gaan dan aerob, maar de aanwijzingen hiervoor zijn niet eenduidig. Dit kan te maken hebben met de verschillen in condities tussen incubatie en de veldsituatie (bijvoorbeeld: anaeroob incuberen van een aerobe bodem). De snellere afbraak in anaerobe bodems werd met name voor bevoeide bodems (rijstvelden-Japan) geconstateerd.

Gegevens over omzetting van andere chloorfenolen in de bodem zijn veel minder beschikbaar en betreffen veelal het waarnemen van het verdwijnen van de stof. Tabel 1 geeft een kort overzicht van de beschikbare waarnemingen. Baker en Mayfield (1980) constateerden, in tegenstelling tot de aerobe incubatie een volledig ontbreken van biologische afbraak in anaeroob geïncubeerde grond voor de getoetste verbindingen. Gibson en Suflita (1986) toonden voor een beperkt aantal mono-, di- en trichloorfenolen een omzetting in een methanogeen aquifermateriaal aan, maar in sulfaathoudend grondwater was geen sprake van biologische omzetting.

Tabel 1. Overzicht van literatuurgegevens over omzetting van chloorfenolen in de bodem.

In het algemeen staat de omzetting of 'verdwijning' aangegeven als percentage na een aantal dagen of als het aantal dagen om een bepaald percentage te bereiken.

De symbolen + en - betekenen dat omzetting tijdens experiment wel resp. niet is aangetoond en de symbolen (+) en (-) dat dit is waargenomen met deze stof als afbraakproduct van een andere stof.

referentie opmerkingen	aerob							anaerob				
	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	1)	8)	9)	10)	
	a)						b)	c)		d)	e)	e)
chloorfenol	[%]	[d]	100% [d]		100% [d]	30 d [%]	T1/2 [d]	[%]	[d]	90 d [%]	100 % [d]	42 d
2-mono	100							78		20-100		
	[d]	1.5	14-47		>64		14-17	80		14-70		+
3-mono	87							37		18-100		
	[d]	160	>47		>64			160		56-70		+
4-mono	83							13		26-100		
	[d]	20	3-9		>16			40		31-142		+
2,3-di												
	[d]											+
2,4-di	81							62		39-100		
	[d]	40	+	5-9	+		55-66	80		(+)		+
2,5-di										48-83		
	[d]			>72	+							+
2,6-di	100							82				
	[d]	1	+		+			80				+
3,4-di	88							0		29-12		
	[d]	160						160		(-)		-
3,5-di												
	[d]									(-)		-
2,3,4-tri												
	[d]		+									
2,4,5-tri	72					80-97		8		52-39		
	[d]	160	+	>47				80		(+)		
2,4,6-tri	95							28				
	[d]	3	+	5-13			14-32	80		7-28		
3,4,5-tri	17							0				
	[d]	160						80		(+)		
2,3,4,5-tetra	31							5				
	[d]	160						80				
2,3,4,6-tetra												
	[d]		+	>72								
penta	80					24-98		7				
	[d]	160	+	>72			17-40	160		14-28		

referenties:

- 1) Baker en Mayfield, 1980
- 2) Valo en Salkinoja-Salonen, 1986
- 3) Alexander en Aleem, 1961
- 4) McRae en Alexander, 1965
- 5) Alexander en Lustigman, 1966
- 6) Vonk et al, 1981
- 7) Smith en Novak, 1987
- 8) Gibson en Suflita, 1986
- 9) Mikesell en Boyd, 1985
- 10) Boyd en Shelton, 1984

opmerkingen:

- a) grondcompostering
- b) ondergrondmateriaal
- c) sulfaatred. aquifer
- d) methanogene aquifer
- e) anaerob vergist.slib

Indirect bewijs voor omzetting van chloorfenolen in de bodem is afkomstig uit het werk van de groep Salkinoja-Salonen. De verdeling van dichloorfenolcongeneren in verontreinigde grond bleek te verschillen van die van het verontreinigende product, waarvoor biodegradatie als oorzaak wordt gesuggereerd (Kitunen et al., 1985, Kitunen et al., 1987 en Valo et al., 1984). Ook tijdens de compostering van verontreinigde grond werd een sterke afname van chloorfenolen geconstateerd (Valo en Salkinoja-Salonen, 1986).

Onderzoek gericht op de kinetiek van de omzetting in de bodem is niet of nauwelijks uitgevoerd. Op basis van omzettingspercentages na een bepaalde periode kunnen natuurlijk halfwaardetijden geschat worden, maar dat lijkt voor dit onderzoek niet relevant omdat het gegevens van omzetting van hoge concentraties (i.h.a. mg-g/kg) betreft. Valo en Salkinoja-Salonen (1986) rapporteerden een halfwaardetijd van 25-50 dagen voor de compostering van de chloorfenolen. Vonk et al. (1981) stelden voor pentachloorfenol halfwaardetijden van 11 dagen of langer vast, toenemend met afnemend organisch stofgehalte, en voor 2,4,5-trichloorfenol varieerde de halfwaardetijd van 8 tot 11 dagen. De beschikbare literatuurgegevens tesamen wijzen op halfwaardetijden voor de chloorfenolen van enkele tot tientallen dagen.

Uit bovenstaand overzicht wordt duidelijk dat de aandacht zich vooral geconcentreerd heeft op omzetting en omzettingsproducten rond verontreinigde situaties en niet zozeer op de relatie naar het milieu en de incubatieomstandigheden, welke juist zou moeten leiden tot een beschrijving (modellering) van de afbraak.

Enige opmerkingen die hierop betrekking hebben kunnen gemaakt worden. Kuwatsuka en Igarashi (1975) vonden dat de pentachloorfenolafbraak afhankelijk was van het organisch stofgehalte. Als sprake was van een laag gehalte (0.04 %) trad geen omzetting op. Mogelijk spelen processen als sorptie (verlagen toxiciteit) en activiteit van de biomassa (wel of geen groei) hierbij een rol. Hetzelfde werd geconcludeerd door Valo en Salkinoja-Salonen (1986) bij het composteringsonderzoek.

Wat betreft de invloed van de temperatuur constateerden Baker et al. (1980) nog omzetting van mono- en dichloorfenolen in de bodem bij 0 en 4 °C. Maar Crawford en Mohn (1985), Valo et al. (1985a) en Trevors (1982) constateerden een volledige remming van de

pentachloorfenolafbraak bij temperaturen lager dan 12 respectievelijk 8 en 4 °C. Valo et al. (1985a) namen een optimumtemperatuur van 28 °C waar en een volledige remming bij 50 °C en Chatterjee et al. (1982) een optimum bij 30 °C en een reductie van de activiteit bij 42 °C. Apajalahti en Salkinoja-Salonen (1987) vonden bij 37-42 °C een optimum in de omzetting van chloorfenolen door *R. chlorophenicus*, en bij 44 °C een vrijwel volledige remming.

De invloed van de zuurgraad is nauwelijks onderzocht. De meeste experimenten zijn bij neutrale pH uitgevoerd, met een variatie van 6.0 tot 7.8. Valo et al. (1985a) stelden een pH-optimum voor de afbraak van pentachloorfenol van 6.0 tot 7.6 vast en een volledige remming van de activiteit bij pH 8.4. Tyler en Finn (1974) rapporteerden een pH-optimum van 7.1 tot 7.8 en een 50 % activiteitsreductie bij pH 6.8 en 8.2. Smith en Novak (1987) toonden afbraak van enkele chloorfenolen in ondergrondmateriaal aan bij een lage pH: 4.5.

Gegevens over de gebonden residuvorming van chloorfenolen zijn in de beschikbare literatuur alleen voor pentachloorfenol en 2,4,6-trichloorfenol gevonden. Onder gebonden residu wordt dat deel van een stof verstaan dat met behulp van organische oplosmiddelen niet van de grond geëxtraheerd kan worden. Voor de gebonden residuvorming van pentachloorfenol zijn percentages van 20 tot 30 procent van de toegepaste dosis (1-10 mg/kg) gevonden (Weiss et al., 1982; Scheunert et al., 1986; Vonk et al., 1981). In geval van 2,4,6-trichloorfenol werd door Scheunert et al. (1987) een percentage van 61 procent vastgesteld.

Het mechanisme van de gebonden residuvorming is nog niet opgehelderd, maar de humusfracties lijken hierin een belangrijke rol te spelen. Weiss et al. (1982) constateerden een binding van pentachloorfenol aan zowel humine, fulvozuren als humuszuren en suggereerden chemische reacties voor de gebonden residuvorming, waarbij niet hydrolyseerbare bindingen gevormd worden of afbraakproducten gebonden worden. Murthy et al. (1979) suggereerden dat bij de gebonden residuvorming pentachlooranisool een rol speelt.

## 2 MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1 Grondsoorten.

De afbraakproeven zijn uitgevoerd met vijf verschillende grondsoorten: Podzolgrond (afgekort PZ; Kootwijk), Eerdgrond (EG; Holten en Rolde), Zeeklei (ZK; Maasdijk) en Duinzand (DZ; Katwijk). Een aantal eigenschappen van de gronden zijn gegeven in tabel 2.

Van deze grondsoorten werd vers, veldvochtig bodemmateriaal van de 10-20 cm laag gebruikt. Dit werd gehomogeniseerd en gezeefd door een zeef van 2 mm om grof materiaal te verwijderen. De grond uit Rolde werd alvorens te zeven eerst een nacht bij kamertemperatuur aan de lucht gedroogd.

Tabel 2. Gegevens over de gebruikte grondsoorten.

monster locatie	grondsoort	bodem afk classificatie	OS [%]	pH [H <sub>2</sub> O]	kalk [%]	lutum [%]	slib [%]	M-cijfer [u]	CFU <sub>5</sub> [*10 <sup>5</sup> /g]
Katwijk	duinzand	DZ vaaggrond	<0.1	9.0	1.7	0.4	0.6	199	1 - 5
Maasdijk	zeeklei	ZK vaaggrond	0.6	8.0	2.3	8.7	12.5	185	10 - 20
Kootwijk	podzol	PZ podzolgrond	0.6	4.4	-	1.2	1.5	137	0.5 - 5
Rolde	eerdgrond	EG eerdgrond	2.8	6.0	-	-	-	-	5 - 15
Holten	eerdgrond	EG eerdgrond	4.0	6.6	-	3.7	4.7	162	-

OS: percentage organisch stof; pH: zuurgraad in 1:5 grond-water; kalk: percentage kalk; lutum: gewichtspercentage lutum; slib: gewichtspercentage slib; M-cijfer [u]; CFU: aantal kolonievormende units op 4-chloorfenol agarplaat [\*10<sup>5</sup>/g].

### 2.2 Chloorfenolen.

De afbraakproeven zijn uitgevoerd met zes verschillende chloorfenolen, die in een cocktail aan de gronden werden toegevoegd. De chloorfenolen zijn geselecteerd op basis van het aantal chloorsubstituenten, persistentie en voorkomen in het milieu. 4-Monochloorfenol werd toegevoegd als een bekend goed afbreekbare verbinding. In tabel 3 zijn de eigenschappen van de gebruikte chloorfenolen gegeven.

De chloorfenolen werden zodanig toegevoegd dat theoretisch de volgende eindconcentraties in de grond werden verkregen:

- 3-monochloorfenol (afgekort 3m)	1000 ug/kg
- 4-monochloorfenol (4m)	1000 ug/kg
- 3,4-dichloorfenol (Di)	250 ug/kg
- 2,4,5-trichloorfenol (Tr(i))	100 ug/kg
- 2,3,4,6-tetrachloorfenol (Te(tra))	50 ug/kg
- pentachloorfenol (Pe(nta))	50 ug/kg

De toe te voegen oplossing werd bereid door geconcentreerde oplossingen van de afzonderlijke chloorfenolen in methanol te verdunnen met steriel water. De fenolcocktail werd steriel gefiltreerd door een 0.2 µm membraanfilter.

Tabel 3. Eigenschappen van de chloorfenolen.

congeneer	afk.	MW	smpt	kpt	p(25)	d(20)	pKa	log Kow	S
3-mono	3m	128	33	214	0.32	1.26	9.37	2.50	26000
4-mono	4m	128	44	220	0.1	1.31	8.97	2.40	27100
3,4-di	di	163	68	253			8.62	3.22	5000
2,4,5-tri	tr(i)	197	69	253	0.05	1.5	6.72	3.72	1200
2,3,4,6-tetra	te(tra)	231	70	subl.		1.6	5.22	4.42	100
penta	pe(nta)	266	174	309	0.0001	1.98	4.74	5.05	14

MW: molecuulgewicht; smpt: smeltpunt [°C]; kpt: kookpunt [°C]; p(25): dampdruk bij 25 °C [mm Hg]; d(20): dichtheid bij 20 °C [kg/m<sup>3</sup>]; pKa: negatieve logaritme van de zuurdissociatieconstante (-log Ka); log Kow: logaritme van de octanol-water verdelingscoëfficiënt; S: oplosbaarheid in water bij 20 °C [mg/l]. (Verschuieren, 1983; Ugland et al., 1983; Xie en Dyrssen, 1984).

### 2.3 Biodegradatie-experimenten.

Gekozen is voor een zoveel mogelijk geïsoleerd onderzoek naar de biodegradatie door vergelijking van resultaten met al dan niet uitgeschakelde biologische processen. Als toetsmethode werd een batchopzet gekozen.

Het principe van de toets was dat een cocktail van chloorfenolen, toegevoegd aan veldvochtig bodemmateriaal, gedurende enige tijd werd geïncubeerd, waarna door analyse van het gehalte van de verschillende chloorfenolen in het bodemmateriaal de afbraak werd beoordeeld. Door vergelijking van (autoklaaf) gesteriliseerde en ongestriliseerde grond werd onderscheid gemaakt tussen biologische en niet-biologische

omzetting. Om een indruk te krijgen van de afbraak onder anaerobe omstandigheden werd in een aantal series een stikstof- of helium-atmosfeer aangebracht. Vanwege de geringste concentratieniveaus (50-1000 ug/kg) tijdens de incubatie was monitoring van de afbraak door middel van mineralisatieparameters (bv. koolstofdioxideproductie) uitgesloten en moest vertrouwd worden op de specifieke analyse van de toegevoegde chloorfenolen. Dus kon alleen een eerste transformatiestap beoordeeld worden. Mogelijk kunnen metabolieten gevormd worden die persistenter, mobieler, meer accumulerend en/of toxischer zijn.

De biodegradatie is in een tweetal proefopzetten onderzocht, waarbij de resultaten van het eerste ofwel vooronderzoek gediend hebben om de opzet van het tweede onderzoek te verbeteren.

De kenmerkende verschillen tussen de twee series experimenten hebben betrekking op de wijze van inzetten van de proef. Bij het vooronderzoek werd de proef in duplo uitgevoerd en bemonstering vond op de achtereenvolgende tijdstippen plaats in dezelfde pot geïncubeerd met grond. Dit resulteert in de acceptatie van eventuele inhomogeniteiten van de monsternamen. Bij het tweede onderzoek werd gewerkt volgens het offeringsprincipe waarbij op elk bemonsteringstijdstip drie geïncubeerde flessen volledig in bewerking werden genomen voor analyse. Dit heeft als bijkomend voor- en nadeel dat elke meetpunt onafhankelijk is van alle andere meetpunten. In het tweede onderzoek werden tevens de tijdstippen van bemonstering aangepast en controles ingevoerd ten aanzien van de toegepaste behandelingen (anaerobie, steriliteit).

### 2.3.1 Het eerste biodegradatie-experiment.

In het eerste experiment werden drie gronden gebruikt: Holten, Kootwijk en Maasdijk. Om een zo homogeen mogelijke verdeling van de chloorfenolen over de grond te verkrijgen en de vochtigheid van de grond niet te veel te beïnvloeden werd telkens aan 100 gram grond 5 ml van de bovengenoemde chloorfenoloplossing toegevoegd, waarna de grond goed geroerd werd. Vervolgens werden vijf zo gevormde porties van 100 gram samengevoegd en nogmaals goed geroerd. Daarna werden vier infuusflessen van 1 liter ieder met 100 gram van deze grond gevuld. Voor de steriele proeven werden de grond en de flessen vooraf met behulp van een



autoclaaf gesteriliseerd (20 min, 121 °C).

Voor anaerobe incubatie werden de flessen afgesloten met een butylrubber septum en met stikstof doorgeblazen. Om praktische redenen was het niet mogelijk de anaerobe flessen onder anaerobe omstandigheden te bemonsteren; de flessen moesten na elke bemonstering opnieuw met stikstof worden doorgeblazen. Om uitdrogen van de grond te voorkomen werd besloten ook de aerobe flessen af te sluiten. Wel werden de flessen van tijd tot tijd geopend om te voorkomen dat ook deze flessen anaerob zouden worden.

Uitvoering van de proefvond in duploplaats.

De flessen werden bij een temperatuur van 10 °C (gemiddelde bodemtemperatuur) in het donker geïncubeerd.

Om een zo homogeen mogelijk monster te krijgen werd ca. 3 gram grond met kleine schepjes van verschillende plaatsen uit de flessen gehaald.

Deze mengmonsters werden onmiddellijk bij een temperatuur van -70 °C ingevroren.

Bemonstering vond plaats na 0, 1, 3, 10, 30 en 77 dagen.

Na 52 dagen incubatie werd voor de steriele potten een steriliteitscontrole uitgevoerd.

### 2.3.2 Het tweede biodegradatie-experiment.

Het voorbehandelde bodemmateriaal (afkomstig uit Rolde, Kootwijk, Katwijk en Maasdijk) werd in porties van 20 gram in 100 schone infuusflessen van 100 ml gedaan. Van elke grondsoort werden 50 flesjes gesteriliseerd in een autoclaaf (20 min., 121 °C). Dit werd na 72 uur herhaald.

Van elke grondsoortserie werden 24 steriele en 24 niet-steriele flessen met grond met behulp van een begassingsinstallatie vacuum gezogen en met helium gevuld. Deze handeling werd driemaal herhaald om volledige zuurstofloosheid te verkrijgen. Bij de steriele flessen werd de helium via een 0.2 um membraanfilter toegediend.

Met behulp van een steriele injectiespuit werd 1 ml van de fenolcocktail aan de grond toegediend.

Monsters werden genomen na 0, 3, 10, 20, 30, 40, en 60 dagen. Op elk van deze tijdstippen werden drie flesjes van elke serie in behandeling

genomen (dus bepaling in triplo). Op dag 0 en dag 60 werden blanco's meebepaald om eventuele veranderingen te kunnen vaststellen, die onafhankelijk van de chloorfenoldosering zijn opgetreden. Op elke monsterdag werden bovendien twee flesjes met alleen chloorfenoloplossing geanalyseerd, ter referentie en als controle op verdamping.

Op elke monsterdag werden monsters van de gasfase in een selectie uit de flesjes met behulp van een gaschromatograaf geanalyseerd op zuurstof, stikstof en koolstofdioxide om de mate van (an)aerobie vast te stellen. Tevens werd de steriliteit van de te analyseren flesjes getest (uitplaattests). Hiertoe werd 0.2 ml van het boraxextract met behulp van een steriele pipet opgebracht op een voedingsbodem van nutriënt-agar, die bij een temperatuur van 10 °C in het donker werd geïncubeerd. Na 10 dagen werden de platen kwalitatief op groei beoordeeld.

#### 2.4 Analysemethode chloorfenolen.

De analysemethode voor grond- en watermonsters die bij de kolon- en degradatieproeven is gebruikt, is ontwikkeld door Abrahamsson en Xie (1983). De methode berust hierop, dat chloorfenolen in basisch milieu worden geëxtraheerd (pH 9), waarna derivatisering plaatsvindt met behulp van azijnzuuranhydride. Na extractie naar een organische fase (petroleumether) wordt geanalyseerd met een gaschromatograaf met Electron Capture Detector (ECD). In het eerste afbraakexperiment is gewerkt volgens een aanpassing van Lagas et al. (1986). Mede in verband met het volume in bewerking te nemen grond werd deze methode verder aangepast voor het tweede afbraakexperiment (Van der Velde, 1987).

Beide methoden en de gaschromatografische condities staan beschreven in bijlage 1.

#### 2.5 Afbraakkinetiek.

Voor de afbraak van organische stoffen kunnen verschillende kinetische modellen worden opgesteld van simpele nulde en eerste orde tot complexe kinetiek met gebroken ordes. Meestal kan volstaan worden met een

simpele benadering door nulde, eerste of tweede orde kinetiek. Een nulde orde proces veronderstelt een lineaire afname van de concentratie van de stof in de tijd. Meestal wordt echter een beschrijving volgens een eerste orde proces gehanteerd, waarbij de afbraaksnelheid afhankelijk is van de concentratie van de stof. Bij kinetiek van de tweede orde is de snelheid afhankelijk van de concentratie van twee componenten. Bij tweede orde afbraak speelt in het algemeen naast de stofconcentratie de biomassaconcentratie een rol, maar gezien de toegepaste concentraties (tot 1 mg/kg) lijkt de aanname gerechtvaardigd dat de biomassa niet verandert tijdens het afbraakproces en zogenaamde pseudo eerste orde kinetiek volgt.

Het model voor de eerste orde kinetiek is als volgt:

$$c_t = c_0 * \exp [-k * (t-t_L)] \quad (\text{vgl. 1})$$

waarin  $t$  de tijd verlopen sinds incubatie,  $k$  de snelheidsconstante,  $c_t$  het gehalte op tijdstip  $t$ ,  $c_0$  de beginconcentratie en  $t_L$  de duur van de lagfase is. De lagfase is de fase waarin microorganismen het enzymstelsel aanpassen aan de af te breken stof en waarin afname van de gehalten nog niet waarneembaar is. De halfwaardetijd  $T_{1/2}$ , de tijd benodigd voor een daling van de concentratie tot de helft van de beginconcentratie, kan worden berekend uit de snelheidsconstante

$$T_{1/2} = \ln 2 / k \quad (\text{vgl. 2}).$$

Schatting van de snelheidsconstante en daarmee de halfwaardetijd wordt verkregen door de logaritme van de concentratie uit te zetten als functie van de tijd en zijn in dit onderzoek berekend door middel van lineaire regressie van de gelineariseerde vergelijking:

$$\ln c_t / c_0 = -k * (t-t_L) \quad (\text{vgl. 3}).$$

Om de halfwaardetijd en de duur van de lagfase zo nauwkeurig mogelijk te kunnen vaststellen met gebruik van alle beschikbare gegevens werd een iteratieproces toegepast, waarbij naar aanleiding van verkregen schatting van de lagfase een verdeling van de gegevens naar behorend tot

de lagfase of het afbraakdeel van de kurve werd gemaakt (zie figuur 1).

Voor de halfwaardetijd werd tevens het 95 % - betrouwbaarheidsinterval

berekend. Voor de berekening van de duur van de lagfase werd een hogere

betrouwbaarheid verkregen door de wijze van berekening van dit interval:

snijsing van de 95 % - betrouwbaarheidsintervallen van het constante en afbraakdeel van de kurve (zie figuur 1).

De nulde orde afbraak kan worden beschreven met de vergelijking:

$$c_t = c_0 - k * (t - t_L) \quad (\text{vgl. 4}),$$

met dezelfde betekenis van de symbolen.

## 2.6 Statistische analyse van de resultaten.

De gegevens verkregen uit de biodegradatieëxperimenten zijn statistisch geanalyseerd met behulp van lineaire regressieanalyse met gebruikmaking

van de methode der kleinste kwadraten. (Hl. uit Draper en Smith, 1966).

Het eerste orde kinetiekmodel is gelineariseerd door de logaritme van de concentratie te nemen (vgl. 3). Hierbij is aangenomen dat de residuen

standaard normaal verdeeld zijn ten opzichte van de  $[\log c - t]$  lijn, hetgeen niet getoetst is, maar gezien de waargenomen variaties in de

gemeten concentraties niet onaannemelijk is.

De gegevens zijn op de volgende aspecten statistisch geanalyseerd:

- verschil steriel en niet steriel;

- afbraakkinetiek nulde of eerste orde; de keuze van het juiste model is

getoetst door middel van statistische analyse met de F-toets, die een

uitspraak doet over de 'lack of fit' van het gehanteerde model, door

vergelijking van de kwadratensom van de gemiddelden ten opzichte van

de totale kwadratensom van elk van de meetpunten.

- met behulp van een iteratieproces zijn de lagfase en halfwaardetijden

voor eerste orde afbraak berekend, inclusief het bijbehorende 95 %

betrouwbaarheidsinterval.

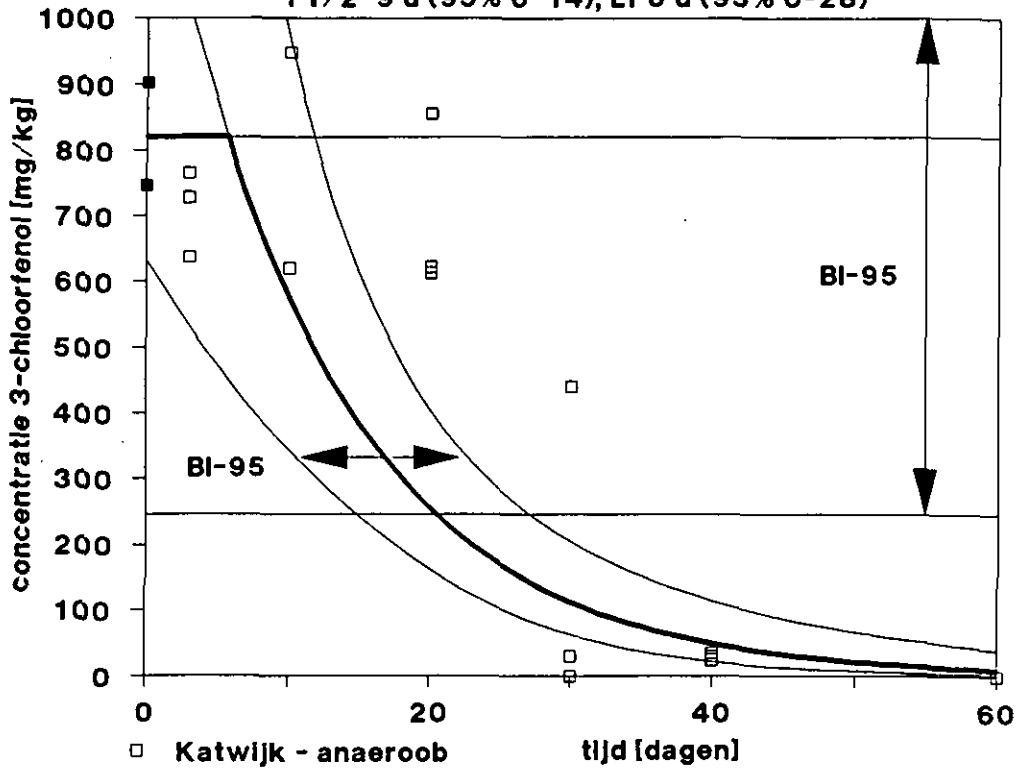
Tijdens het iteratieproces (voorbeeld figuur 1) wordt de lagfase

stapsgewijs verlengd met een volgende set van meetpunten (volgende

tijdstip van monstername) indien de lagfase berekend door kruising van

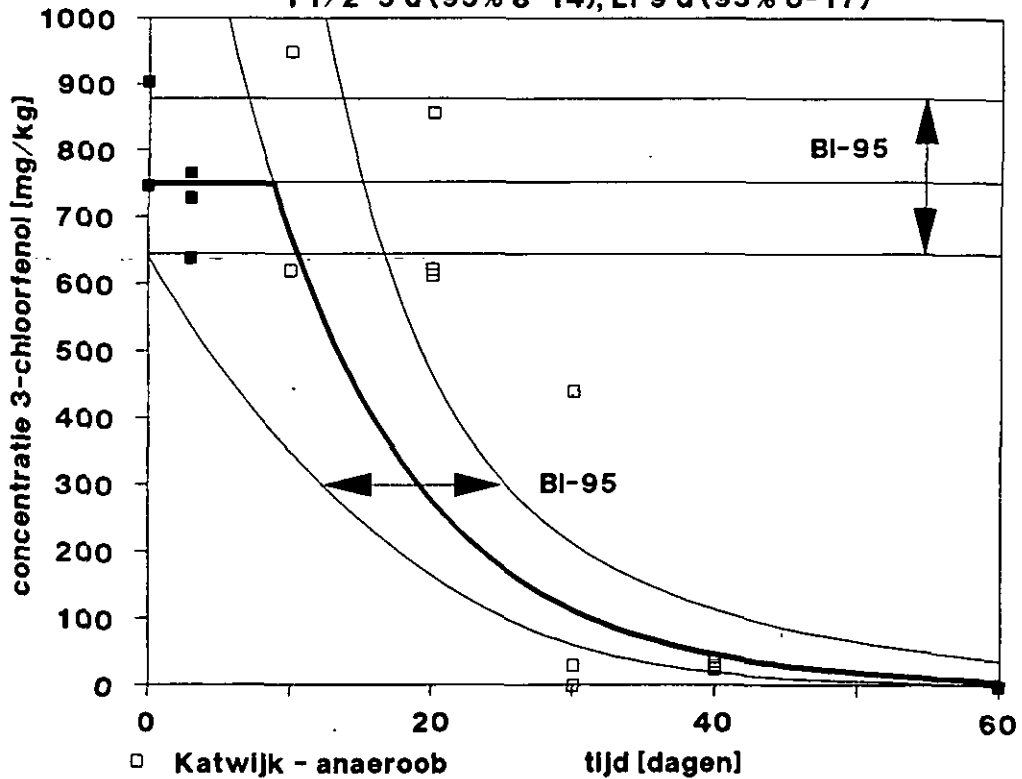
### Analyse Lagfase/Halfwaardetijd. Stap 1.

$T_{1/2}$  9 d (95% 6-14), Lf 6 d (95% 0-28)



### Analyse Lagfase/Halfwaardetijd. Stap 2.

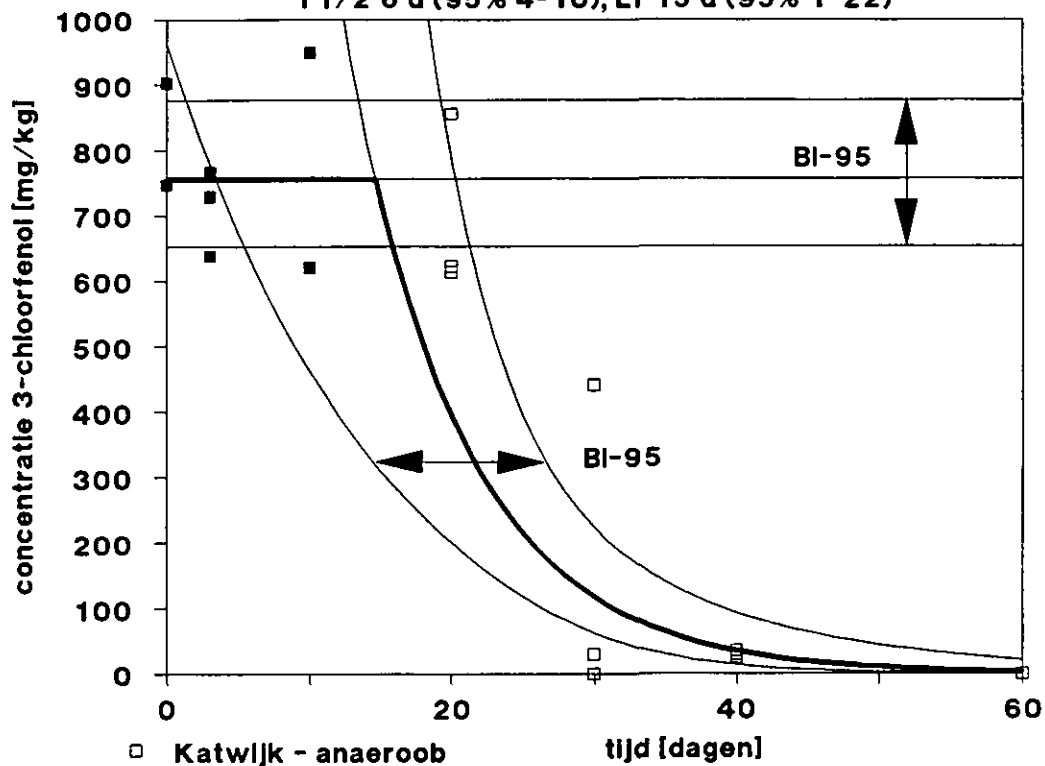
$T_{1/2}$  5 d (95% 8-14), Lf 9 d (95% 0-17)



Figuur 1. Voorbeeld van de stapsgewijze analyse van de duur van de lagfase en de halfwaardetijd (en hun 95 % betrouwbaarheidsintervallen [B.I.-95]), in dit geval de anaerobe omzetting van 3-chloorfenol in duinzand. De analyse bepaalt welke meetpunten behoren tot het lagfasedeel van de curve (dichte hokje) en tot het afbraakdeel (open hokje). De getrokken lijnen tonen de berekende afbraakcurve en de bijbehorende 95%-betrouwbaarheidskurven.

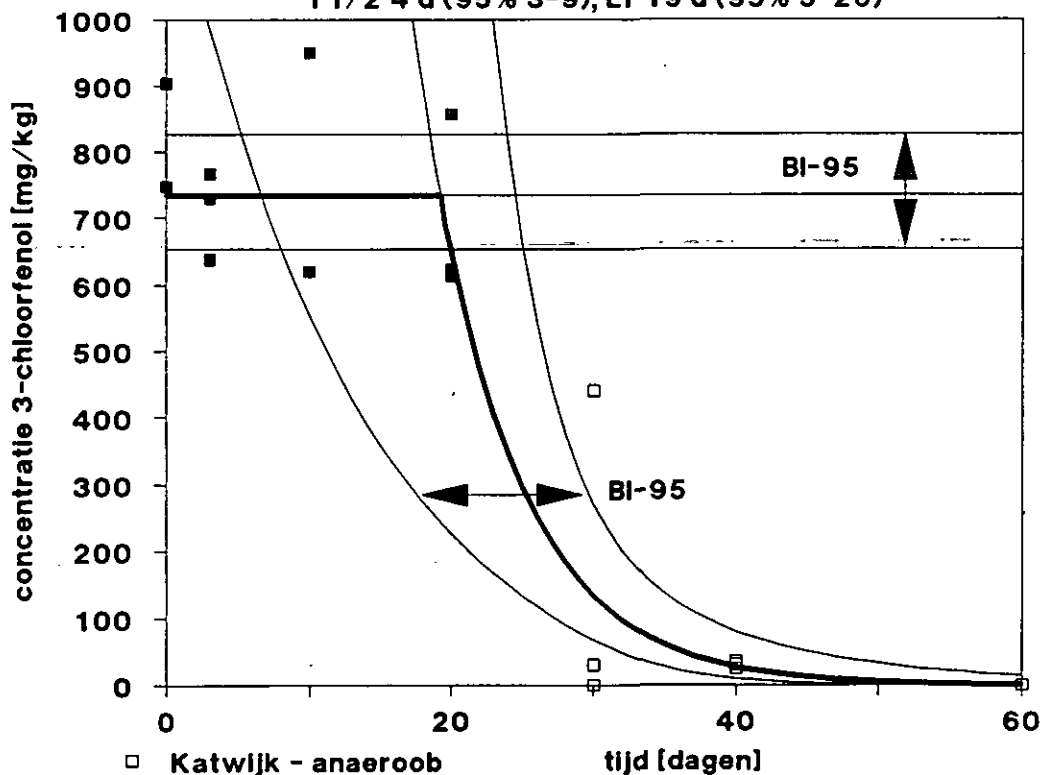
### Analyse Lagfase/Halfwaardetijd. Stap 3.

$T_{1/2}$  6 d (95% 4-10),  $L_f$  15 d (95% 1-22)



### Analyse Lagfase/Halfwaardetijd. Stap 4.

$T_{1/2}$  4 d (95% 3-9),  $L_f$  19 d (95% 5-26)



Vervolg Figuur 1. Derde en vierde stap in de stapsgewijze analyse van de duur van de lagfase en de halfwaardetijd van de anaerobe omzetting van 3-chloorfenol in duinzand.

de eerste orde afbraaklijn (berekend op de overgebleven meetpunten) en de lagfaselijn (gemiddelde waarde van de meetpunten in deze lagfase)

langer is dan het de lagfaseduur die aangenomen is bij de berekeningen.

Om deze analyse te kunnen uitvoeren zijn de ruwe analyseresultaten als volgt bewerkt:

- onbetrouwbare analyseresultaten zijn vervallen;
- de eerste keer dat in een triploserie de analyseresultaten op gehalten nul (0) zijn vastgesteld, zijn deze opgenomen met de detectiegrens als concentratie met een vaste variatiecoëfficiënt.

### 3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

Achtereenvolgens zullen de resultaten van de verschillende metingen en berekeningen van het eerste en tweede afbraakexperiment gepresenteerd worden. Ten aanzien van de resultaten van het eerste onderzoek dient enig voorbehoud te worden gemaakt vanwege enkele vraagtekens. Deze vraagtekens betreffen de kwaliteit van de analyses en het ontbreken van meerdere gegevens zodat waar mogelijk op een aantal kunstgrepen moest worden teruggevallen om de gegevens te kunnen interpreteren. De resultaten worden achtereenvolgens behandeld in de volgorde van onderzoek naar incubatieomstandigheden, chloorfenolenconcentratie als functie van de tijd en de daarvan afgeleide resultaten.

#### 3.1 Incubatieomstandigheden.

##### 3.1.1 Mate van (an)aerobie.

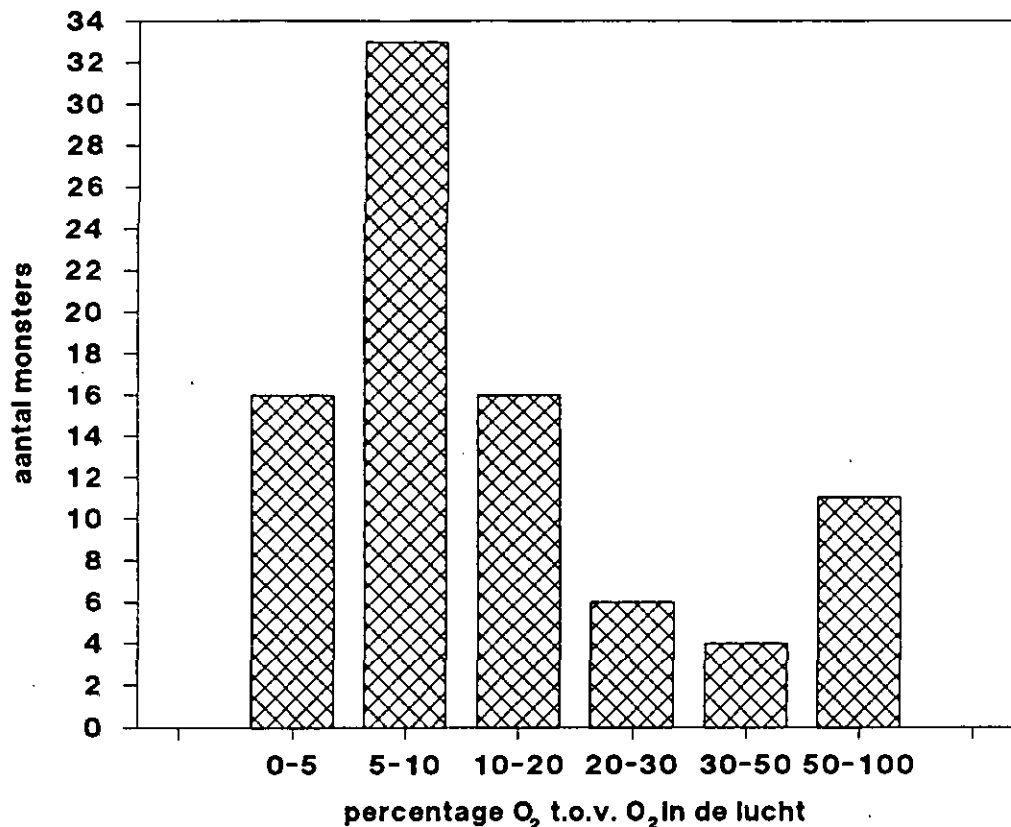
In het eerste afbraakexperiment zijn geen analyses van de gasfase verricht om de handhaving van de (an)aerobie te kunnen vaststellen. Op basis van de resultaten en met name verschillen in resultaten voor duplo's kan geconcludeerd worden dat van anaerobie niet altijd sprake geweest zal zijn.

In het tweede experiment is op elke monsterdag steeksgewijs de gasfase bemonsterd. Alle aerob geïncubeerde flessen waren nog aerob, hetgeen op basis van de hoeveelheid aanwezige organische stof ook verwacht werd. Figuur 2 laat een frequentieverdeling zien van de in de anaerobe flessen waargenomen zuurstofgehalten. Hieruit blijkt dat in plaats van anaerob beter van zuurstofarm kan worden gesproken omdat altijd wel kleine hoeveelheden zuurstof werden gemeten. Of dit door de wijze van meting werd veroorzaakt is nog niet nader geanalyseerd. Niet in alle gevallen bleek deze mate van afwezigheid van zuurstof gehandhaafd te zijn tijdens de incubatie.

##### 3.1.2 Mineralisatie.

Meting van de koolstofdioxideproductie zou mogelijk iets over de





Figuur 2. Histogram van het aantal anaeroob geïncubeerde monsters (totaal 86) verdeeld over een aantal klassen van het daarin bij monsternamen gemeten percentage zuurstof (relatief ten opzichte van het percentage zuurstof in de lucht).

mineralisatie van de organische stof in de bodem en van de chloorfenolen kunnen zeggen. Berekening van de verhouding organische stof ten opzichte van de chloorfenolen (20-600 mg t.o.v. 25 ug) geeft aan dat een eventuele CO<sub>2</sub>-productie uit chloorfenol niet te onderscheiden is van die uit de bodem organische stof, hetgeen ook volgt uit de daadwerkelijk gemeten CO<sub>2</sub>-gehalten (tabel 4) die beduidend hoger liggen dan uit chloorfenolomzetting mogelijk is.

De mineralisatie van de bodem organische stof van blanco's was even hoog als voor met chloorfenol geïncubeerde bodems, het voorgaande nogmaals bevestigend.

De waargenomen mineralisatie nam ten aanzien van de grondsoort af in de volgorde ZK > EG >> PZ > DZ, niet geheel in overeenstemming met het organische stofgehalte van de bodem.

Tabel 4. Productie van koolstofdioxide [percentage koolstofdioxide in de bovenstaande gasfase] als functie van bodemtype (DZ: duinzand, ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond) en incubatiecondities (A: aerob, AN: anaerob, S: steriel, NS: niet steriel), al dan niet in aanwezigheid van het chloorfenolenmengsel, na 60 dagen incubatie.

	met/zonder chloorfenolen	A/NS	A/S	AN/NS	AN/S
Duinzand	met	0.5- 0.8	d <sup>#</sup>	1.0- 1.1	d
	zonder	0.2- 0.5	d	d	d
Zeeklei	met	8.9-17.5	d -15.2	7.1-12.0	0.4- 1.4
	zonder	13.5-15.5	2.2-27.0	6.4- 7.7	1.0- 1.3
Podzol	met	2.4- 4.0	d - 5.3	3.6- 5.2	d
	zonder	3.3- 3.5	d - 7.9	1.8- 2.4	d
Eerdgrond	met	5.1-12.3	7.8-17.6	7.6-12.8	0.4- 0.6
	zonder	11.0-12.8	0.6- 3.5	5.5- 7.5	0.5- 0.8

# d: percentage onder de detectiegrens.

3.1.2 De aerobe mineralisatie lag hoger dan de anaerobe mineralisatie.

3.1.3 Mineralisatie trad merkwaardig genoeg ook op in de steriele monsters, maar was lager dan in niet gesteriliseerde monsters.

### 3.1.3 Steriliteit.

De steriliteit werd in het eerste afbraakexperiment alleen aan het einde van de incubatieperiode gecontroleerd en hierbij bleek alleen de PZ steriel gebleven te zijn.

De methode toegepast in het tweede experiment, autoklaveren en dat herhaald na 72 uur, en geen meervoudige monsternamen uit dezelfde fles, bleek effectief en in geen enkele geval trad groei op van kolonies. Dit in tegenstelling tot de niet gesteriliseerde monsters waarvoor een niet nader gekwantificeerde groei optrad.

### 3.1.4 Vervluchtiging.

Uit een (bij het tweede afbraakexperiment) parallel uitgevoerde proef van flessen met chloorfenolenoplossing zonder grond kon worden geconcludeerd dat in de periode van 60 dagen geen vervluchtiging of

chemische afbraak in water van de chloorfenolen optrad (bijlage 6), overeenkomstig de gegevens uit de literatuur (zie H 1.3).

### 3.2 Omzetting van de chloorfenolen.

De hoeveelheid chloorfenolen die geanalyseerd werd bestond uit de hoeveelheid opgelost in het bodemvocht en datgene wat reversibel geadsorbeerd zat aan de vaste fase en geëxtraheerd kon worden. De niet door analyse teruggevonden hoeveelheid chloorfenolen bestond uit de omgezette en irreversibel gebonden chloorfenolen.

De resultaten voor de twee experimenten, de gemeten concentraties als functie van de tijd, zijn gegeven in respectievelijk bijlage 2 en 3.

De voor statistische analyse bewerkte resultaten zijn opgenomen in de bijlagen 4 en 5.

Uit het verloop van de curven kunnen verschillende parameters en processen worden bepaald:

- De recovery's op  $t=0$  vertellen iets over de instantane gebonden residu vorming direct na contact tussen stof en grond;

- Eventuele afname van de concentraties in de steriele monsters geeft informatie over de chemische omzetting en gebonden residu vorming;

- Het verschil tussen steriele en niet-steriele resultaten geeft informatie over de microbiologische afbraak; er kan onderscheid worden gemaakt tussen aerobe en anaerobe afbraak;

- Het verloop van de concentraties als functie van de tijd biedt informatie over de afbraakkinetiek en de bijbehorende parameters, in dit geval afbraakpercentages, halfwaardetijden en lagfasen.

#### 3.2.1 Gebonden residuen en chemische afbraak.

De omvang van de twee omzettingsprocessen chemische afbraak en vorming van gebonden residuen werd in gesteriliseerde monsters, waarin biologische processen uitgesloten zijn, onderzocht.

In het proces gebonden residu vorming kunnen twee fasen onderscheiden worden (Lagas et al., 1986): de zeer snelle vorming direct na contact tussen stof en grond en als tweede het proces in de tijd, waarvoor Lagas et al. (1986) een evenredige toename met de wortel van de tijd

vaststelden. Dit tweede fysische proces (Karickhoff en Morris, 1985)

kan alleen tegelijkertijd met de chemische omzettingsprocessen

onderzocht worden. Aangenomen wordt dat kort na toevoegen van de stof

chemische omzetting nog geen rol zal spelen. De vraag blijft natuurlijk

in hoeverre gebonden residu vorming als een van de chemisch processen

beschouwd kan worden.

Om de instantane vorming van het gebonden residu enerzijds en het

tijdsproces anderzijds te kunnen beoordelen zijn naast elkaar bekeken:

- de gemeten concentraties op het starttijdstip ten opzichte van de

theoretisch verwachte concentratie;

- de concentratie als functie van de tijd in de steriele monsters.

Voor het eerste afbraakexperiment kon de instantane gebonden residu

vorming niet op basis van startmonsters geanalyseerd worden omdat de

concentraties op dat tijdstip berekend moesten worden op basis van 100 %

recovery. Omdat met uitzondering van pentachloorfenol (vanaf t=3

dagen), wel bruikbare gegevens van monstername na één (1) dag

beschikbaar waren, zijn deze gebruikt onder dezelfde aanname van geringe  
chemische omzetting.

De recovery's van de chloorfenolen voor het eerste afbraakexperiment na

één dag incubatie zijn gegeven in tabel 5. Hieruit kan geconcludeerd

worden dat de recovery wat betreft bodemtype, respectievelijk stof afnam

in de volgorde:

$PZ = EG < ZK,$

$Pe > Di - Tr - Te > 4m > 3m$

en dat in deze volgorde de gebonden residu vorming dus toenam.

Steriel waren de recovery's hoger dan niet steriel. Tussen aeroob en  
anaeroob geïncubeerde monsters traden geen verschillen op.

De recovery's van de gemeten startconcentratie ten opzichte van het

theoretisch gehalte voor het 2e afbraakexperiment zijn gegeven in tabel

6. De tabel toont dat de gehalten gemeten op t=0 lager waren dan wat

verwacht werd op basis van de toegevoegde hoeveelheid stof. Blijkbaar

was de tijd verstreken vanaf het toevoegen van de chloorfenolen en het

moment van extraheren (2-8 uur) voldoende geweest om gebonden residuen

te vormen.

Deze instantane gebonden residu vorming nam toe wat betreft de stof in

Tabel 5. Gemiddelde recovery's van het eerste afbraakexperiment voor de getoetste chloorfenolen als functie van bodemtype (ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond) en incubatiecondities (A: aerob, AN: anaerob, S: steriel, NS: niet steriel) na 1 dag incubatie t.o.v. t=0.

bodemtype + incubatiecond.		gemiddelde recovery na 1 dag incubatie t.o.v. t=0					na 3 dagen t.o.v. t=0
		3m	4m	di	tr	te	pe
A/NS	ZK	0.46	0.36	0.66	0.82	0.58	1.03
	PZ	0.61	1.00	1.18	1.04	0.86	1.38
	EG	0.68	0.50	0.72	0.81	0.61	1.01
AN/NS	ZK	0.50	0.46	0.74	0.96	0.78	1.71
	PZ	0.51	1.30	0.72	1.00	0.86	0.55
	EG	1.06	1.16	1.02	1.10	0.81	0.95
A/S	ZK	0.70	0.66	0.70	0.66	0.71	1.64
	PZ	1.16	1.22	0.92	1.35	0.98	1.52
	EG	0.94	1.24	1.37	1.25	1.51	0.91
AN/S	ZK	1.03	0.84	0.76	0.70	0.69	1.32
	PZ	1.37	1.92	1.22	1.59	1.76	1.39
	EG	1.03	1.34	1.34	1.46	1.16	1.61

Tabel 6. Gemiddelde recovery's van het tweede afbraakexperiment voor de getoetste chloorfenolen als functie van bodemtype (DZ: duinzand, ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond) en incubatiecondities (A: aerob, AN: anaerob, S: steriel, NS: niet steriel) op t=0 t.o.v. de theoretisch toegevoegde concentratie.

bodemtype + incubatiecond.		gemiddelde recovery op t=0 t.o.v. de theoretisch toegevoegde concentratie.					
		3m	4m	di	tr	te	pe
A/NS	DZ	0.67	0.54	1.18	1.07	1.06	0.52
	ZK	0.38		0.75	0.77	0.63	0.21
	PZ	0.59	0.35	1.13	1.09	1.04	0.43
	EG	0.42	0.26	0.75	0.79	0.74	0.31
AN/NS	DZ	0.81	0.65	1.40	1.23	1.18	0.54
	ZK	0.29		0.56	0.62	0.54	0.17
	PZ	0.61	0.41	1.16	1.15	0.99	0.38
	EG	0.35		0.80	0.72	0.74	0.39
A/S	DZ	0.71	0.58	1.19	1.09	0.99	0.50
	ZK	0.54	0.42	0.80	0.93	0.83	0.29
	PZ	0.96	0.81	1.61	1.49	1.44	0.62
	EG	0.55	0.44	0.83	0.78	0.76	0.24
AN/S	DZ	0.90	0.73	1.59	1.36	1.27	0.57
	ZK	0.64	0.59	1.01	1.00	0.83	0.29
	PZ	0.91	0.75	1.56	1.38	1.26	0.52
	EG	0.82	0.70	1.26	1.20	1.24	0.43

de volgorde  $Tr = Te = Di > 3m > 4m > Pe$  en wat betreft grond  $DZ > PZ >> EG > ZK$ . Ook in dit experiment bleken de steriele recovery's hoger dan niet steriel.

De gebonden residuvorming was alleen wat betreft pentachloorfenol anders tussen het 1e en 2e afbraakexperiment. Waarom zulke lage recovery's in het 2e experiment werden gevonden is nog niet opgehelderd. Duidelijk is dat de recovery's van 3- en 4-chloorfenol in het algemeen laag zijn, terwijl deze voor Di, Tr en Te in het algemeen op één (1) liggen. Zoekend naar een verklaring dient wel de betrouwbaarheid van de analyse in relatie tot de variatie van de concentratie en recovery's meegenomen te worden, hoewel gedurende de ontwikkeling van de analysemethode hoge recovery's waren gevonden (Van der Velde, 1987). Afgezien van het gedrag van penta in het 2e experiment zouden de resultaten wijzen op een relatie van toenemende gebonden residuvorming met toenemende zuurdissociatieconstante pKa. Voor de grondsoorten geldt dat de recovery afnam in de volgorde  $DZ > PZ > EG > ZK$ , hetgeen met uitzondering voor de positie van duinzand overeenkomt met een toenemende zuurgraad van de bodem. Een eenduidige relatie van de recovery met bodemparameters werd alleen gevonden met het lutumgehalte: toenemend lutumgehalte, afname recovery. Hydrofobe sorptie en opvolgende gebonden residuvorming als mechanisme is niet de juiste verklaring voor de waarnemingen omdat dan een omgekeerde volgorde van ZK ten opzichte van PZ en EG verwacht zou zijn. In PZ en EG zijn de chloorfenolen voornamelijk als de ongedissocieerde verbindingen aanwezig en deze gronden bevatten minstens evenveel organische stof als de ZK.

Waarschijnlijk liggen aan het verschijnsel gebonden residuvorming meerdere mechanismen ten grondslag, waarvan een reactie tussen kleimineralen en chloorfenolen er een zou kunnen zijn. Maar dit lijkt in tegenspraak met de waarneming dat de recovery's steriel hoger zijn dan niet steriel. Dit wijst op een vernietiging van bindingsplaatsen door het steriliseren. Het verschil in recovery, ofwel het verlies aan bindingsplaatsen was groter naarmate de grond een hoger organisch stofgehalte en een hogere pH had. Voor zover onderzoek is uitgevoerd (Lagas et al. 1986), is aangetoond dat de toegepaste sterilisatiemethode tot een significante verhoging (factor 3-7) van de opgeloste

organische stof leidde die echter nauwelijks invloed had op het totale organische stofgehalte van de vaste fase. Het feit dat in een grondsoort zonder organische stof geen significante verschillen in recovery worden gevonden tussen steriel en niet steriel op dag nul (0), ondersteunt de gedachte dat de organische stof betrokken is bij de gebonden residuvorming.

Wat betreft het gedrag van de gebonden residuvorming als functie van de tijd en chemische omzetting kunnen alleen de gegevens van de steriele monsters gebruikt worden. Het optreden van chemische afbraak en verdere gebonden residuvorming kan uitgesloten worden indien de concentraties constant blijven in de tijd. Vertaald naar eerste orde kinetiek betekent dit een snelheidsconstante gelijk aan nul (0) ofwel een oneindige halfwaardetijd. De tabellen 7, en 8 geven de halfwaardetijden van de steriel geïncubeerde monsters.

In het eerste afbraakexperiment kon in 30 van de 36 steriele stof-grond combinaties een snelheidsconstante groter dan nul (0) berekend worden, dus omzetting (tabel 7). In het algemeen lagen de halfwaardetijden wel een factor 1-10 hoger dan voor de vergelijkbare niet steriele incubatie. De afbraak in de steriele monsters kon echter verklaard worden door het feit dat, op de PZ-monsters na, de grond niet steriel was gebleven. In de steriele PZ-potten waren de halfwaardetijden minstens een factor 8 hoger dan de vergelijkbare niet steriele.

In het tweede afbraakexperiment werd de steriliteit, vooral door de gewijzigde experimentele opzet, goed gehandhaafd en hierbij werd in slechts 10 van de 48 steriele grond-stof combinaties een significante afname van de chloorfenolconcentraties vastgesteld, waarbij de snelheden minstens een factor tien (10) lager waren dan de aangetoonde microbiologische afbraak en het betrof steeds 3-mono- en 3,4-dichloorfenol.

In een aantal gevallen was zelfs sprake van een verhoogde recovery in de loop van de tijd, mogelijk als gevolg van een verdergaande destructureering of herstructureering van de bodem.

In tegenstelling tot de resultaten van Lagas et al. (1986) werd in dit onderzoek geen toename van de gebonden residuvorming gedurende de incubatieduur waargenomen.

Tabel 7. Lagfasen en halfwaardetijden berekend voor de eerste orde afbraak in het le afbraakexperiment. De gegevens zijn gegroepeerd per bodemtype (PZ: podzol, ZK: zeeklei, EG: eerdgrond), incubatieconditie (A: aerob, AN: anaerob) en gescheiden voor de steriele (S) en niet steriele (NS) incubatie. Gegeven zijn resp. minimum, gemiddelde en maximum. De aanduiding 9999 wijst op een toename van de concentratie in de tijd.

chlorofenol	Niet steriele incubatie.						Steriele incubatie		
	Duur van de lagfase [d]			Halfwaardetijd [d]			Halfwaardetijd [d]		
	min.	gem.	max.	min.	gem.	max.	min.	gem.	max.
	PZ-NS-A						PZ-S-A		
3-mono	0	0	9	15	19	26	89	177	27051
4-mono	0	0	77	23	34	68	119	1147	9999
3,4-di	0	5	34	7	11	34	95	207	9999
2,4,5-tri	0	5	77	6	16	9999	148	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	0	40	14	20	33	102	230	9999
penta	0	6	77	4	16	9999	100	1223	9999
	PZ-NS-AN						PZ-S-AN		
3-mono	0	0	77	16	24	54	64	180	9999
4-mono	0	3	77	25	43	144	58	1436	9999
3,4-di	0	0	67	12	14	17	74	206	9999
2,4,5-tri	0	0	71	11	17	43	84	647	9999
2,3,4,6-tetra	0	0	37	14	20	37	58	9999	9999
penta	0	0	77	8	18	9999	63	1945	9999
	ZK-NS-A						ZK-S-A		
3-mono	0	0	10	10	15	26	11	18	50
4-mono	0	0	3	1	2	6	23	32	53
3,4-di	0	0	27	8	11	20	43	68	175
2,4,5-tri	0	0	60	16	23	43	38	56	107
2,3,4,6-tetra	0	0	23	12	16	22	24	35	61
penta	0	0	32	12	17	25	29	48	130
	ZK-NS-AN						ZK-S-AN		
3-mono	0	0	17	11	16	26	12	14	17
4-mono	0	0	2	1	1	7	17	69	9999
3,4-di	0	0	77	11	23	9999	13	20	46
2,4,5-tri	0	0	77	26	49	379	44	72	195
2,3,4,6-tetra	0	0	65	20	36	179	28	44	106
penta	0	6	77	11	29	9999	37	96	9999
	EG-NS-A						EG-S-A		
3-mono	0	0	31	9	12	19	152	270	1221
4-mono	0	0	49	20	32	83	22	45	9999
3,4-di	0	0	24	9	11	16	36	74	9999
2,4,5-tri	0	0	77	28	34	45	29	63	9999
2,3,4,6-tetra	0	0	29	19	25	35	22	43	509
penta	0	23	77	21	45	9999	37	99	9999
	EG-NS-AN						EG-S-AN		
3-mono	0	0	14	11	14	18	165	9999	9999
4-mono	0	0	46	18	27	55	174	9999	9999
3,4-di	0	0	33	12	15	20	107	884	9999
2,4,5-tri	0	0	17	49	80	220	85	2572	9999
2,3,4,6-tetra	0	0	2	36	61	211	305	9999	9999
penta	0	0	77	42	103	9999	126	9999	9999



Tabel 8. Lagfasen en halfwaardetijden berekend voor de eerste orde afbraak in het 2e afbraakexperiment. De gegevens zijn gegroepeerd per bodemtype (DZ: duinzand, ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond), incubatieconditie (A: aeroob, AN: anaeroob) en gescheiden voor de steriele (S) en niet steriele (NS) incubatie. Gegeven zijn resp. minimum, gemiddelde en maximum. De aanduiding 9999 wijst op een toename van de concentratie in de tijd.

Chloorfenol	Niet steriele incubatie.						Steriele incubatie		
	Duur van de lagfase [d]			Halfwaardetijd [d]			Halfwaardetijd [d]		
	min.	gem.	max.	min.	gem.	max.	min.	gem.	max.
	DZ-NS-A						DZ-S-A		
3-mono	0	11	17	3	4	12	534	9999	9999
4-mono	0	0	3	7	9	13	9999	9999	9999
3,4-di	0	8	19	8	11	20	719	9999	9999
2,4,5-tri	0	5	15	9	12	20	9999	9999	9999
2,3,4,6-tetra	5	10	14	3	4	5	9999	9999	9999
penta	0	0	8	7	10	16	9999	9999	9999
	DZ-NS-AN						DZ-S-AN		
3-mono	5	19	26	3	4	9	163	9999	9999
4-mono	0	0	19	7	9	13	1295	9999	9999
3,4-di	0	8	20	17	23	35	165	9999	9999
2,4,5-tri	0	10	19	10	13	19	9999	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	8	18	5	7	11	9999	9999	9999
penta	0	0	15	7	9	14	9999	9999	9999
	ZK-NS-A						ZK-S-A		
3-mono	0	0	4	2	3	5	118	9999	9999
4-mono	geen gegevens			geen gegevens			9999	9999	9999
3,4-di	0	7	13	2	3	5	78	1113	9999
2,4,5-tri	0	3	9	5	7	9	335	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	0	7	10	15	26	344	9999	9999
penta	0	0	7	6	9	16	160	9999	9999
	ZK-NS-AN						ZK-S-AN		
3-mono	0	0	3	2	3	4	112	2565	9999
4-mono	geen gegevens			geen gegevens			9999	9999	9999
3,4-di	0	4	17	6	9	17	92	386	9999
2,4,5-tri	0	7	21	6	12	85	9999	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	3	15	7	11	26	9999	9999	9999
penta	0	0	60	16	30	319	9999	9999	9999
	PZ-NS-A						PZ-S-A		
3-mono	1	3	4	2	2	2	150	9999	9999
4-mono	0	0	60	3	11	9999	9999	9999	9999
3,4-di	0	7	13	4	4	6	129	307	9999
2,4,5-tri	0	0	34	10	16	33	9999	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	0	57	24	29	35	9999	9999	9999
penta	0	0	60	28	38	61	9999	9999	9999
	PZ-NS-AN						PZ-S-AN		
3-mono	0	0	5	3	4	7	115	318	9999
4-mono	0	0	2	1	2	3	9999	9999	9999
3,4-di	0	8	15	3	4	7	135	393	9999
2,4,5-tri	0	0	10	14	17	22	9999	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	2	25	25	31	39	9999	9999	9999
penta	0	4	60	39	60	125	9999	9999	9999
	EG-NS-A						EG-S-A		
3-mono	2	3	4	2	2	2	73	308	9999
4-mono	0	0	2	2	3	17	9999	9999	9999
3,4-di	0	5	11	3	4	7	87	385	9999
2,4,5-tri	0	2	22	12	20	63	9999	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	0	15	20	26	35	9999	9999	9999
penta	0	4	24	24	31	42	6928	9999	9999
	EG-NS-AN						EG-S-AN		
3-mono	2	3	5	2	2	2	72	124	435
4-mono	0	3	7	7	10	18	9999	9999	9999
3,4-di	0	2	25	9	13	23	83	158	1836
2,4,5-tri	0	8	27	23	34	66	684	9999	9999
2,3,4,6-tetra	0	3	21	22	28	40	289	9999	9999
penta	0	0	60	27	34	46	169	9999	9999

De gebonden residuvorming was steeds afhankelijk van de stof en het type grond en werd tot 75 % van de oorspronkelijke concentraties waargenomen, maar lag in het algemeen op 20-30 %, overeenkomstig hetgeen in de literatuur wordt genoemd. In vergelijking met het onderzoek van Lagas et al. (1986), waar de grond stoomgesteriliseerd werd, werden iets lagere of gelijke recovery's gevonden. In het onderzoek van TNO (Vonk et al., 1981) zijn de gebonden residuen van pentachloorfenol door middel van labeling gemeten, waarbij maximaal 30 % als gebonden residu werd gemeten.

### 3.2.2 Microbiologische afbraak.

Of microbiologische omzetting is opgetreden dient afgeleid te worden uit de vergelijking tussen de afname van de chloorfenolenconcentratie in de tijd in niet en wel steriel geïncubeerde monsters, waarbij aangenomen wordt dat behalve het microbiologische omzettingsproces alle andere processen (chemische omzetting, gebonden residuvorming en adsorptie/desorptie) onbeïnvloed gehandhaafd blijven, indien sterilisatie wordt toegepast.

Deze vergelijking kan het beste uitgevoerd worden door de halfwaardetijden voor steriel en niet steriele incubatie te vergelijken. Deze zijn voor de respectievelijke afbraakexperimenten gegeven in de tabellen 7 en 8. Uit de vergelijking van halfwaardetijden met betrouwbaarheidintervallen van steriele en niet-steriel geïncubeerde monsters blijkt dat niet steriel altijd significant hogere snelheden werden waargenomen, ten opzichte van steriel. Opvallend is dat in het 1e experiment waar de steriliteit niet gehandhaafd was, de resultaten steriel/niet steriel vergelijkbaar waren.

### 3.2.3 Omzettingspercentages.

De tabellen 9 en 10 tonen de percentages omzetting van respectievelijk het 1e en 2e afbraakexperiment. In beide gevallen zijn de percentages berekend op basis van de op t=0 waargenomen concentraties en niet de theoretisch toegevoegde concentraties.

De gemiddelde omzettingspercentages, berekend op basis van de op t=0

Tabel 9. Omzettingspercentages van chloorfenolen na 77 dagen incubatie in het eerste omzettingsexperiment als functie van bodemtype (ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond) en de mate van aerobie (A: aerob, AN: anaerob).

bodemtype + incubatiecond.	3m	4m	di	tr	te	pe
ZK-NS-A	97- 99	74- 77	99-100	88- 92	97- 98	94- 96
ZK-NS-AN	97- 99	69- 95	59- 98	39- 83	58- 93	0- 96
PZ-NS-A	96	71- 89	97- 99	79- 99	83- 98	59- 99
PZ-NS-AN	86- 96	0- 67	97- 99	86- 99	88- 97	73- 99
EG-NS-A	98- 99	87- 89	99	76- 87	88- 94	35- 75
EG-NS-AN	97- 98	82- 85	94- 99	42- 52	62- 72	9- 71

Tabel 10. Minimum en maximum percentage omzetting van chloorfenolen na 60 dagen incubatie in het tweede omzettingsexperiment als functie van bodemtype (DZ: duinzand, ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond) en de mate van aerobie (A: aerob, AN: anaerob).

bodemtype + incubatiecond.	3m	4m	di	tr	te	pe
DZ-NS-A	100	100	91- 99	87- 99	100	97-100
DZ-NS-AN	100	100	72- 82	88- 94	98-100	97-100
ZK-NS-A	100	nb <sup>#</sup>	100	100	93- 97	100
ZK-NS-AN	100	nb	96- 97	52- 98	58- 96	14- 91
PZ-NS-A	100	100	100	83- 99	70- 78	50- 82
PZ-NS-AN	100	100	100	83- 91	66- 73	44- 55
EG-NS-A	100	100	100	69- 98	69- 77	58- 77
EG-NS-AN	100	100	71-100	33- 74	61- 78	64- 82

#: nb = kan niet berekend worden.

gemeten gehalten, varieerden na 60 of 77 dagen incubatie van 40 tot 100 %, waarbij onder zuurstofarme omstandigheden lagere percentages (40-100) werden berekend dan onder aerobe (55-100), maar gezien de variatie in de resultaten is dit niet significant. De hoogste omzettingspercentages werden waargenomen in duinzand (77-100), gevolgd door zeeklei (52-100), podzolgrond (50-100) en eerdgrond (40-100). De omzetting van de specifieke verbindingen 3- en 4-mono-, en 3,4-dichloorfenol was in het

algemeen volledig, terwijl van de andere chloorfenolen slechts incidenteel volledige omzetting werd waargenomen. De omzettingspercentages namen af ten aanzien van de stof in de volgorde:  $3m = 4m >= Di > Tr >= Te >= Pe$ . In het algemeen kan dus gesteld worden dat het omzettingspercentage afnam met de mate van chlorering.

Het is mogelijk dat als gevolg van nalevering vanuit gebonden residu vorming; zoals bijvoorbeeld gevonden in het onderzoek van Vonk et al. (1981) voor pentachloorfenol, een volledige omzetting niet meetbaar is en een soort evenwicht nalevering/omzetting gemeten wordt.

De omzettingspercentages over de twee experimenten samen zijn aeroob groter dan of gelijk aan anaeroob geïncubeerde grond.

### 3.2.4 Afbraakkinetiek.

Op voorhand is de keuze gemaakt de modellering zo simpel mogelijk te houden. Gezien de lage chloorfenolconcentraties werd niet of nauwelijks een verandering van de biomassa verwacht en de keuze daarom beperkt tot nulde of (pseudo) eerste orde kinetiek. De keuze nulde of eerste orde is gemaakt door op basis van statistische analyses met behulp van de F-toets de 'lack of fit' van de gehanteerde modellen te toetsen.

Tabel 11. Resultaten van de F-toets voor analyse van de kinetiek van de omzetting in het 2e afbraakexperiment. De resultaten zijn gegeven voor de toetsing van het nulde en het eerste orde model en dan voor de niet steriele afbraak, aeroob en anaeroob, per bodemtype en chloorfenolcongener.

Symbolen: 1 = F-waarde  $\leq 1$ ; dus niet verwerpen model; \* = F-waarde  $\leq 1$  maar met een andere duur van de lagfase; (1) = F-waarde  $> 1$  en  $< 1.1$ ; # = onvoldoende gegevens; - = F-waarde  $> 1$ .

bodemtype + incubatiecond.	model 0e orde						model 1e orde					
	3m	4m	di	tr	te	pe	3m	4m	di	tr	te	pe
Aeroob												
DZ	1	*	-	-	*	-	1	1	-	-	1	-
ZK	*	#	*	*	*	1	1	#	1	1	*	1
PZ	#	*	-	-	-	(1)	#	1	1	(1)	-	1
EG	#	#	*	-	*	*	#	#	1	1	*	*
Anaeroob												
DZ	1	*	1	-	-	*	1	1	1	-	-	-
ZK	#	#	1	1	1	1	1	#	1	1	1	1
PZ	#	#	*	*	1	1	#	#	1	1	1	1
EG	#	1	1	1	(1)	(1)	#	#	1	1	1	1

Overeenkomstig de verwachting werd voor de steriele monsters geen onderscheid gevonden, vanwege de vrijwel constante concentraties in deze monsters als functie van de tijd.

Tabel 11 geeft de resultaten van de F-toets aan voor de niet steriele stof-grond combinaties voor zowel het nulde als eerste orde model. In een groter aantal gevallen werd een niet verwerpen van de eerste orde kinetiek (28 van de 39) vastgesteld dan van de nulde orde kinetiek (13 van de 39), hoewel deze getallen nader naar elkaar konden worden gebracht indien de duur van de lagfase werd gevarieerd. Dat in een deel van de gevallen de nulde orde kinetiek voldeed was niet verwonderlijk gezien de bemonsteringsfrequentie ten opzichte van de berekende halfwaardetijden. Indien een correcte analyse van nulde of eerste orde kinetiek gewenst zou zijn, zou een andere testopzet gekozen moeten worden.

Bij de uitwerking van de resultaten is verder uitgegaan van eerste orde afbraakkinetiek.

### 3.2.5 Lagfasen.

Nadat was vastgesteld dat voor de afbraakkinetiek een eerste orde proces gehanteerd kan worden, zijn door middel van een iteratieproces de duur van de lagfase en de halfwaardetijden berekend met bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen.

De lagfasen berekend voor de niet steriel geïncubeerde monsters van het eerste en tweede afbraakexperiment zijn gegeven in de tabellen 7 respectievelijk 8.

In het eerste afbraakexperiment zijn slechts incidenteel lagfasen waargenomen en berekend als gevolg van de bemonsteringsfrequentie. In het tweede experiment werden lagfasen berekend van 0 tot 10 dagen, met een enkele uitzondering van 20 dagen (in DZ). De lagfasen anaeroob waren in het algemeen langer dan aeroob. Wat betreft de grondsoort nam de lagfase af in de volgorde: DZ > EG >= PZ = ZK. Een verklaring voor deze volgorde zou in de activiteit en grootte van de biomassa kunnen liggen. De door bepaling van het koloniegetal (gegeven in tabel 2) bepaalde volgorde in de biomassa nam als volgt toe: DZ <= PZ <= EG <= ZK.

Het onderscheidend vermogen was door de bemonsteringsfrequenties in de beide proeven gering voor een precieze bepaling van de duur van de lagfase, maar, als trend is, voor de chloorfenolen de volgende volgorde voor toenemende duur van de lagfase aan te geven:  $4m \leq Pe \leq Tr - Te \leq 3m \leq Di$ .

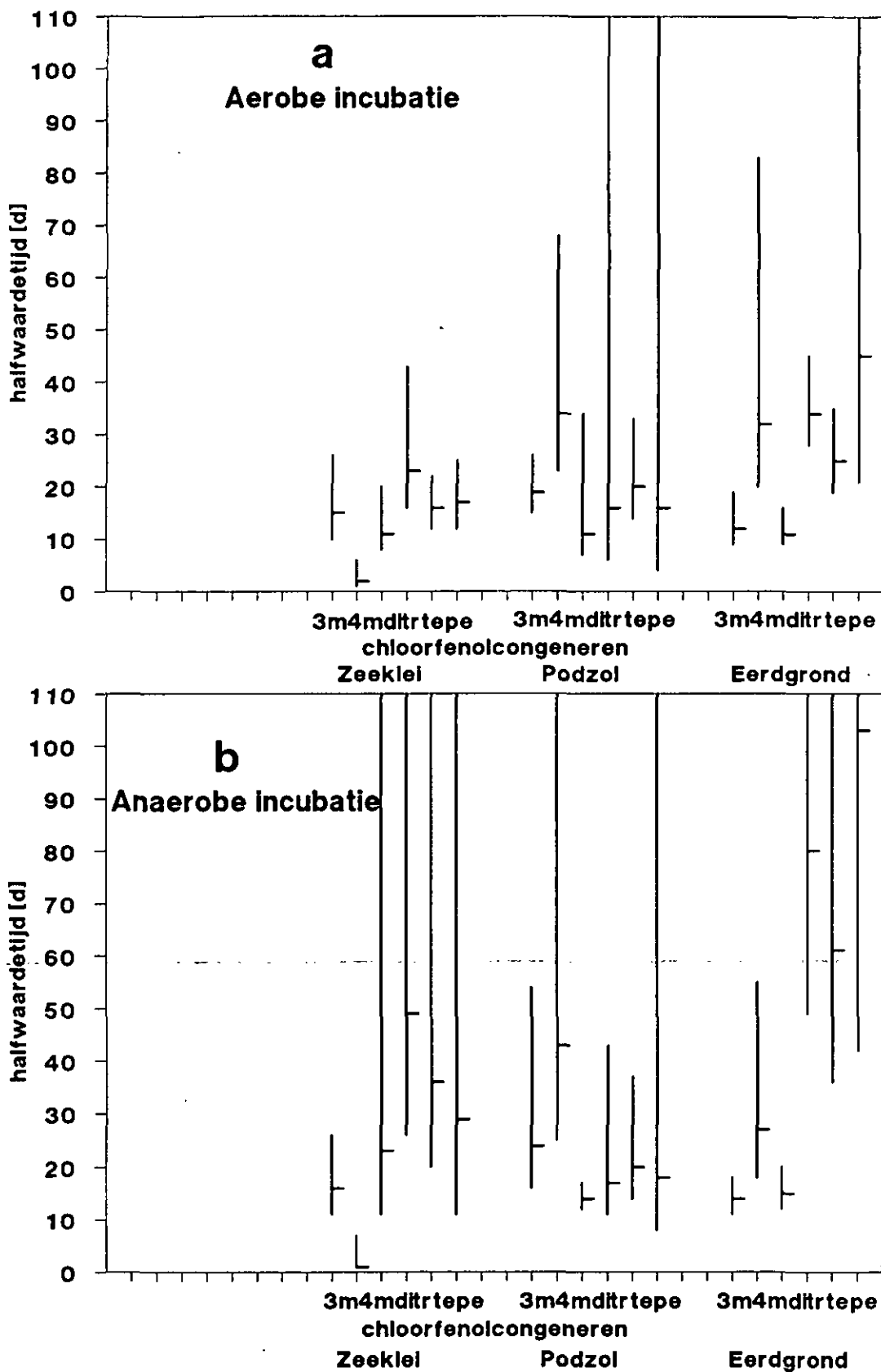
### 3.2.6 Halfwaardetijden.

Zoals uiteengezet in het voorafgaande zijn de halfwaardetijden berekend na correctie, voor de duur van de lagfase, bepaald met behulp van een iteratieproces.

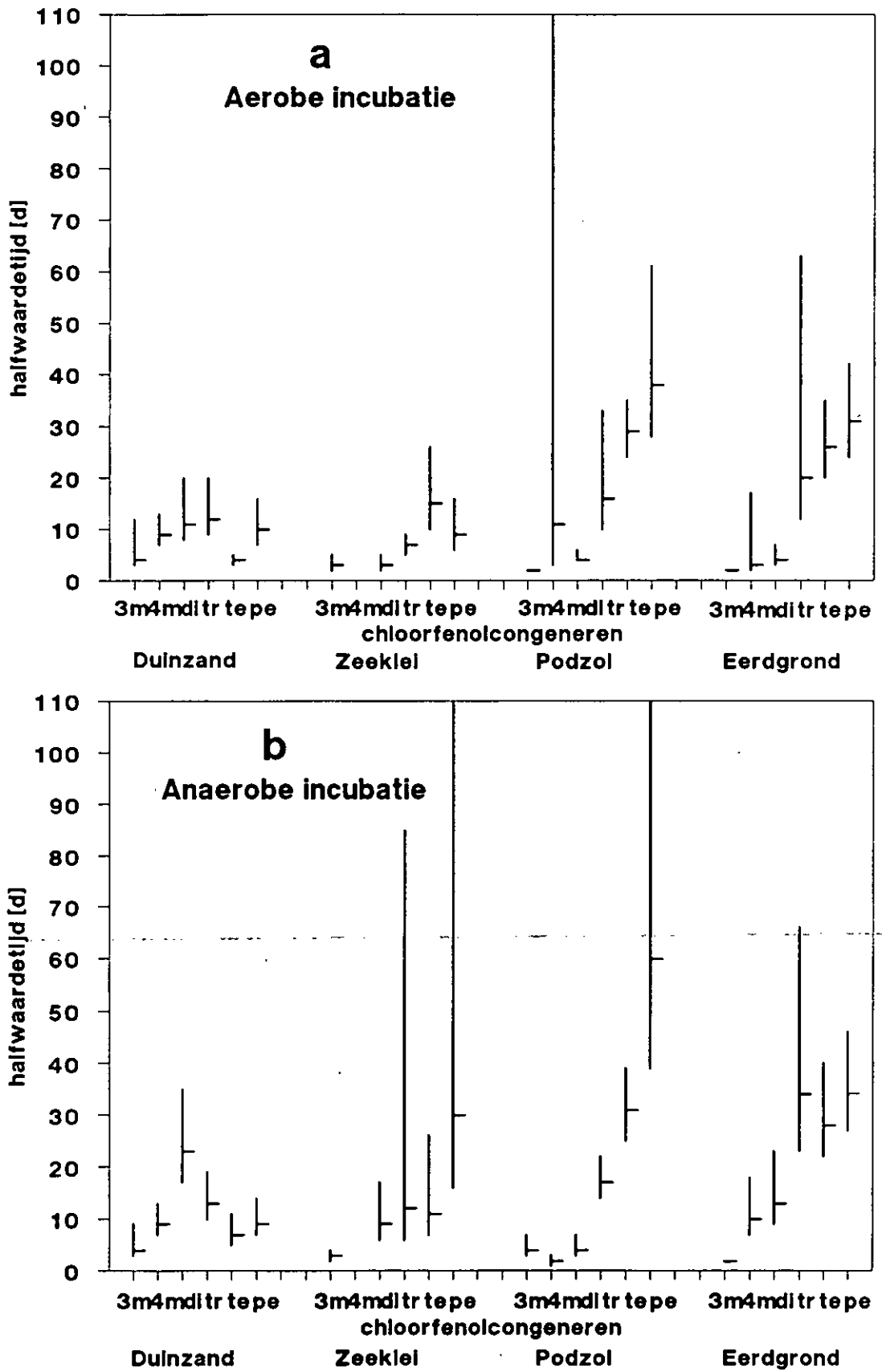
De halfwaardetijden zijn gegeven in de tabellen 7 en 8 voor respectievelijk het eerste en tweede afbraakexperiment en ten behoeve van de vergelijking zijn de resultaten van de niet steriel geïncubeerde monsters (microbiologische omzetting) uitgezet in de figuren 3 en 4. De halfwaardetijden voor de biologische omzetting variëren van 1 tot 103 dagen en waren van het eerste afbraakexperiment (1-103 dagen) langer dan van het tweede experiment (2-60 dagen). Dit wordt mogelijk veroorzaakt door de sterk uiteenlopende bemonsteringstijdstippen van de twee experimenten, waarbij in het eerste experiment het interessante gebied gemist is. Dit is de reden waarom in het tweede experiment de frequentie is aangepast.

De berekende halfwaardetijden komen goed overeen met de halfwaardetijden die in de literatuur gegeven zijn of daaruit afgeleid kunnen worden: van enkele tot tientallen dagen.

Met slechts een enkele uitzondering werd geen significant verschil berekend voor aerob en anaerob geïncubeerde grond. Dat anaerobie mogelijk toch tot sterk gereduceerde afbraaksnelheden zou kunnen leiden kan afgeleid worden uit de analyse per serie van de gegevens uit het eerste afbraakexperiment met zeeklei (tabel 12). In een van de duplo's is sprake van resultaten vergelijkbaar met de aerobe duplo's. In het andere monster liggen de afbraaksnelheden voor di- en hoger gesubstitueerde chloorfenolen een factor 5-7 lager. Door het ontbreken van een controle van de anaerobie is hierover verder geen discussie te voeren. In het tweede experiment waren dit soort analyses niet mogelijk door de onderlinge onafhankelijkheid van de monsters, maar de



Figuur 3. De gemiddelde halfwaardetijden met hun 95 % betrouwbaarheidsinterval als functie van bodemtype en chloorfenolcongeneren voor het eerste afbraakexperiment. A: aerobe incubatie, B: anaerobe incubatie.



Figuur 4. De gemiddelde halfwaardetijden met hun 95 % betrouwbaarheidsinterval als functie van bodemtype en chloorfenolcongener voor het tweede afbraakexperiment. A: aerobe incubatie, B: anaerobe incubatie.



Tabel 12. Analyse van de lagfase en de halfwaardetijd in het eerste afbraakexperiment per ingezette niet steriele (NS) serie.

De gegevens zijn gegroepeerd per bodemtype (PZ: podzol, ZK: zeeklei, EG: eerdgrond) en incubatieconditie (A: aerob, AN: anaerob):

Chloorfenol	duploserie 1		duploserie 2	
	lagfase [d]	halfwaarde tijd [d]	lagfase [d]	halfwaarde tijd [d]
PZ-NS-A				
3-mono	0	19	0	19
4-mono	0	26	0	49
3,4-di	0	10	8	13
2,4,5-tri	1	12	11	27
2,3,4,6-tetra	0	15	10	25
penta	4	10	17	36
PZ-NS-AN				
3-mono	0	18	0	35
4-mono	0	48	0	9999
3,4-di	0	16	0	13
2,4,5-tri	0	13	1	26
2,3,4,6-tetra	0	16	0	27
penta	0	12	1	40
ZK-NS-A				
3-mono	0	12	0	19
4-mono	0	2	0	2
3,4-di	0	13	0	10
2,4,5-tri	0	26	0	21
2,3,4,6-tetra	0	17	0	14
penta	3	15	0	19
ZK-NS-AN				
3-mono	0	18	0	13
4-mono	0	2	0	1
3,4-di	0	13	0	94
2,4,5-tri	0	29	0	165
2,3,4,6-tetra	0	21	0	120
penta	0	17	21	153
EG-NS-A				
3-mono	0	11	0	14
4-mono	0	31	0	34
3,4-di	0	12	0	10
2,4,5-tri	0	41	0	30
2,3,4,6-tetra	0	30	0	21
penta	21	72	0	43
EG-NS-AN				
3-mono	0	14	5	14
4-mono	0	28	13	23
3,4-di	0	13	3	17
2,4,5-tri	0	86	6	69
2,3,4,6-tetra	0	97	0	45
penta	0	9999	0	52

analyseresultaten waren in het algemeen goed vergelijkbaar en gaven geen aanwijzingen voor een verschil tussen aeroob en anaeroob. Maar in de anaerobe series van dit experiment werden wel steeds kleine hoeveelheden zuurstof aangetoond (figuur 2). De vraag is daarom in hoeverre de aanwezigheid van kleine hoeveelheden zuurstof toch aanleiding zou kunnen zijn tot aerobe omzetting.

Wat betreft de grondsoorten wordt met enige uitzonderingen een volgorde van toenemende halfwaardetijden gevonden van: DZ < ZK < PZ = EG. In duinzand worden de chloorfenolen het snelst afgebroken, alleen zoals in het voorafgaande is gesteld meestal pas na een bepaalde lagfase. In eerdgrond en podzolgrond vindt de afbraak mogelijk trager plaats door een verhoogde sorptie. Het is mogelijk dat de afbraaksnelheid beperkt wordt door de desorptiesnelheid.

Zowel in het eerste als tweede afbraakexperiment is waargenomen dat de omzettingssnelheid afnam met de mate van chlorering. De halfwaardetijden namen toe in de volgorde: 3m = 4m = Di < Te < Tr = Pe. In duinzand en enigermate in zeeklei werden vergelijkbare halfwaardetijden berekend voor alle chloorfenolen. Tussen Tr, Te en Pe worden geen significante verschillen aangetoond, maar wel de boven aangegeven trend.

Opvallend in alle experimenten is het gedrag van 4-chloorfenol, waar naast zeer korte halfwaardetijden ook langere halfwaardetijden worden berekend. Bij 4-chloorfenol zou een deel van de verklaring kunnen liggen in de ten opzichte van andere stoffen veel lagere gevoeligheid van de analyse die ook tot uiting komt in de detectiegrens die op 170 ug/kg ligt, ten opzichte van 30 ug/kg en lager voor de andere chloorfenolen. Anderzijds is een vorming van 4-chloorfenol uit de andere aanwezige hoger gechloroerde fenolen gesuggereerd.

Een verklaring voor de verschillen in de halfwaardetijden op basis van het voorkomen van de isomeer in de fenolaat- of fenolvorm is niet eenduidig.

De hoge activiteit in duinzand ten opzichte van met name de hoger gechloroerde fenolen is mogelijk verklaarbaar door de hogere beschikbaarheid van de stoffen: minder sorptie (als gevolg van de hogere

pH (en het lagere organische stofgehalte) en minder gebonden residu  
vorming. Dat voor de mono- en dichloorfenolen de relatief langste  
halfwaardetijden in duinzand werden gemeten, kan mogelijk verklaard  
worden in samenhang met het optreden van de langste lagfasen in deze  
grond. Blijkbaar was nog een proces van adaptatie en groei van de  
biomassa van afbrekers nodig. En inderdaad werden in duinzand de  
laagste aantallen kolonies van 4-chloorfenolafbrekers bepaald.  
Een verdere relatie tussen het koloniegetal bepaald voor de  
verschillende gronden en de halfwaardetijden werd niet gevonden.  
Hierbij dient wel te worden opgemerkt dat dit getal slechts een ruwe  
indicatie van de actieve populatie geeft, omdat het dan om de specifieke  
chloorfenolen afbrekers kan gaan.

De trage afbraak van tri-, tetra- en pentachloorfenol in de eerdgrond en  
podzol is te verklaren door aan te nemen dat de beschikbaarheid vanuit  
de desorptie de afbraak beperkt.

Voor het opstellen van een model voor de voorspelling van het gedrag van  
organische stoffen is het daarom van belang zowel over kinetische  
gegevens van sorptie en desorptie als van omzetting te beschikken. De  
relatie tussen deze gegevens legt uiteindelijk de waar te nemen kinetiek  
vast.

Bij de discussie over de biologische afbraak van de chloorfenolen dienen  
nog een tweetal opmerkingen gemaakt te worden.

Ten eerste is de afbraak alleen als specifieke afbraak van de  
oorspronkelijke chloorfenol gemeten, terwijl eigenlijk alleen de  
mineralisatie van belang is. De meting van mineralisatie of  
metabolieten is noodzakelijk om de gevonden resultaten ten aanzien van  
de biologische afbraak te bevestigen.

Ten tweede kan in de gemeten systemen sprake geweest zijn van onderlinge  
beïnvloeding van de stoffen, omdat in een mengsel getoetst is. Met name  
kan hierbij aan cometabolisme gedacht worden. Hier tegenover staat  
echter dat in de in de praktijk gebruikte isomeren veelal aanzienlijke  
verontreinigingen met andere isomeren aanwezig zijn.

#### 4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Vervluchtiging van de getoetste chloorfenolen werd niet waargenomen.

Binnen 2-8 uur na start van de incubatie in het 2e afbraakexperiment was al gebonden residuvorming opgetreden, resulterend in een verlaagde recovery bij de analyse. Er is nog geen goede verklaring geformuleerd voor het mechanisme achter dit proces en de parameters waar dit van afhankelijk is. Nader onderzoek hiernaar, ook in relatie tot de betrouwbaarheid van de analyse, is noodzakelijk om verdere uitspraken te kunnen doen.

In het algemeen werd een slechte recovery gevonden voor 4-chloorfenol en pentachloorfenol en in mindere mate voor 3-chloorfenol.

De recovery's namen wat betreft bodemtype af in de volgorde DZ >= PZ >> EG >= ZK.

Hydrofobe sorptie en vervolgens vorming van het gebonden residu lijkt niet alleen het verklarende mechanisme te zijn. Mogelijk spelen andere processen een rol, bijvoorbeeld een interactie met kleimineralen.

De vraag is in hoeverre sterilisatie de voortgang van gebonden residuvorming en chemische omzetting beïnvloedt, omdat aangenomen wordt dat deze processen in steriele en niet-steriele monsters op gelijke wijze verlopen.

De gehalten in de gesteriliseerde grond als functie van de tijd waren constant of namen zelfs toe. Chemische omzetting leek dus geen rol te spelen. Ook de gebonden residu vorming trad direct op en nam niet meer toe in de loop van de tijd.

In het algemeen kan gesteld worden dat de getoetste chloorfenolen tijdens de niet-steriele incubatie microbiologisch werden omgezet. In deze opzet betrof dat alleen de primaire omzetting van de moederstof.

De omzettingspercentages varieerden na 60 of 77 dagen incubatie van 40 tot 100 %, met lagere percentages onder zuurstofarme (>40) dan aerobe (>55) omstandigheden en namen af in de volgorde duinzand (>77), zeeklei (>52), podzolgrond (>50) en eerdgrond (>40).

Het percentage omzetting nam af met toenemende mate van chlorering en de primaire omzetting was steeds volledig voor 3- en 4-chloorfenol, voor dichloorfenol aerob, maar slechts incidenteel voor de andere chloorfenolen.

Het microbiologische afbraakproces kan het beste met een eerste orde kinetiek worden beschreven, hoewel voor de monochloorfenolen ook nulde orde toegepast kan worden.

De lagfase varieerde van 0 tot 10 dagen, met een enkele uitzondering van 20 dagen in duinzand. Geen verschil werd vastgesteld tussen aerobe en zuurstofarme incubatie. Als trend leek een toename van de lagfase met de mate van chlorering aanwezig.

Aanwijzingen werden gevonden voor een relatie tussen de duur van de lagfase en de bij start aanwezige specifieke 'afbrekende' biomassa.

De halfwaardetijden varieerden van 1 tot 103 dagen over de twee experimenten samen. De halfwaardetijden in het verbeterde tweede experiment varieerden van 2 tot 60 dagen.

Met slechts een enkele uitzondering was geen significant verschil aanwezig tussen aerob en zuurstofarm geïncubeerde grond. Maar in het algemeen lijkt de anaerobe omzetting van chloorfenolen iets langzamer te verlopen dan de aerobe. Het verschil in halfwaardetijd blijkt het grootst te zijn bij toename van het aantal chloorsubstituenten.

In het eerste afbraakexperiment is een aanwijzing gevonden (in de serie anaerob-zeeklei) dat de anaerobe afbraak van de en hoger gechlorideerde fenolen veel trager verloopt dan de aerobe.

In het algemeen volgde uit de onderlinge vergelijking van de ligging van de halfwaardetijden en bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen dat sprake was van een toenemende halfwaardetijd bij toename van het aantal chloorsubstituenten. Alleen in duinzand bleken de halfwaardetijden vrijwel onafhankelijk van de mate van chlorering.

Wat betreft de grondsoorten nam de halfwaardetijd toe met toename van het organisch stofgehalte, in volgorde van toenemende halfwaardetijd:  $DZ < ZK < PZ = EG$ . Mogelijk wijst dit op desorptie als snelheidsbeperkende stap. Een directe relatie tussen de afbraaksnelheid

en de populatiegrootte werd niet gevonden.

Op basis van de verkregen gegevens is nog geen betrouwbare voorspelling mogelijk voor het gedrag van andere chloorfenolen of in andere bodemtypen omdat de mechanismen achter de omzetting nog niet doorzien worden. De omzetting is afhankelijk van bodemtype, type chloorfenol en incubatieomstandigheden; maar hoe precies is nog de vraag. In ieder geval is naast informatie over de afbraak ook die over (de)sorptie en met name de kinetiek ervan van belang.

Het onderzoek zal zich met name moeten richten op de beschikbaarheid van de stof voor de micro-organismen: zit de stof reversibel of irreversibel gebonden, in welke vorm (fenol of fenolaat) bevindt de stof zich en wat is de invloed van de bodemvochtconcentratie ?

Nader onderzoek is noodzakelijk naar het lot van de transformatieproducten van de getoetste chloorfenolen. Belangrijk is de vraag of volledige mineralisatie plaatsvindt en/of welke metabolieten met welke eigenschappen worden gevormd. Op basis van alleen de koolstofdioxideproductie is als gevolg van de lage toetsstofconcentraties niets te zeggen over het optreden van mineralisatie.

Met name het toepassen van radioactief gelabelde materialen lijkt hierbij van grote betekenis.

LITERATUURREFERENTIES

- Abrahamsson, K., and T.M. Xie. 1983. Direct determination of trace amounts of chlorophenols in fresh water, waste water and sea water. *J. Chromatogr.* 279: 199-208.
- Alexander, M., and M.I.H. Aleem. 1961. Effect of chemical structure on microbial decomposition of aromatic herbicides. *J. Agr. Food Chem.* 9: 44-47.
- Alexander, M., and B.K. Lustigman. 1966. Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes. *J. Agr. Food Chem.* 4: 410-413.
- Allard, A-S., M. Remberger, and A.H. Neilson. 1987. Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 839-845.
- Apajalahti, J.H.A., and M.S. Salkinoja-Salonen. 1986. Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 62-67.
- Apajalahti, J.H.A., and M.S. Salkinoja-Salonen. 1987. Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *J. Bacteriol.* 169: 675-681.
- Baker, M.D., and C.I. Mayfield. 1980. Microbial and non-biological decomposition of chlorophenols and phenol in soil. *Water Air Soil Poll.* 13: 411-424.
- Baker, M.D., C.I. Mayfield, and W.E. Inniss. 1980. Degradation of chlorophenols in soil, sediment and water at low temperature. *Water Res.* 14: 1765-1771.
- Boyd, S.A., and D.R. Shelton. 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 272-277.
- Chatterjee, D.K., J.J. Kilbane, and A.M. Chakrabarty. 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 514-516.
- Crawford, R.L., and W.W. Mohn. 1985. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7: 617-620.
- Dekker, R.H. 1983. Zwarte-lijststoffen; stand van zaken in de Europese

Gemeenschap. H O. 16: 274-279.

Deul, P.C. 1987. Mobiliteit en afbreekbaarheid van chloorfenolen in grond: Stageverslag. RIVM-rapport no. 728603002. RIVM, Bilthoven.

Draper, N.R., and H. Smith. 1966. Applied Regression Analysis. John Wiley & Sons Inc., New York.

Engelhardt, G., P.R. Wallnöfer, W. Mücke, and G. Renner. 1986. Transformations of pentachlorophenol. Part II: Transformations under environmental conditions. Toxicol. Environ. Chem. 11: 233-252.

Gibson, S.A., and J.M. Suflita. 1986. Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 52: 681-688.

Hakulinen, R., M.S. Salkinoja-Salonen, and M.-L. Saxelin. 1981. Purification of kraft bleach effluent by an anaerobic fluidized bed reactor and aerobic trickling filter at semitechnical scale (Enso-Fenox). Proc. Techn. Ass. Pulp Paper Ind., Envir. Conf. TAPPI Press, Atlanta Ga. pp 197-203.

Karickhoff, S.W., and K.R. Morris. 1985. Sorption dynamics of hydrophobic pollutants in sediment suspensions. Environm. Toxicol. Chem. 4: 469-479.

Karns, J.S., S. Duttgupta, and A.M. Chakrabarty. 1983. Regulation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and chlorophenol metabolism in *Pseudomonas cepacia* AC1100. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1182-1186.

Kaufman, D.D. 1978. Degradation of pentachlorophenol in soil, and by soil microorganisms. Environ. Sci. Res. 12: 27-39.

Keuning, S., and D.B. Janssen. 1987. Microbiologische afbraak van zwarte en prioritaire stoffen voor het milieubeleid. VROM, CDVEB, Den Haag.

Kitunen, V., R. Valo, and M. Salkinoja-Salonen. 1985. Analysis of chlorinated phenols, phenoxyphenols and dibenzofurans around wood preserving facilities. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 20: 13-28.

Kitunen, V.H., R.J. Valo, and M.S. Salkinoja-Salonen. 1987. Contamination of soil around wood-preserving facilities by polychlorinated aromatic compounds. Environ. Sci. Technol. 21: 96-101.

Kuwatsuka, S., and M. Igarashi. 1975. Degradation of PCP in soils. II. The relationship between the degradation of PCP and the properties of soils, and the identification of the degradation products of PCP.



Soil Sci. Plant Nutr. 21: 405-414.

Lagas, P., M.C. Snell, and H. Wytzes. 1986. Sorptie van chloorfenolen in de bodem. RIVM-rapport no. 728603001. RIVM, Bilthoven.

MacRae, I.C., and M. Alexander. 1965. Microbial degradation of selected herbicides in soil. J. Agr. Food Chem. 13: 72-75.

Matthes, G., M. Isenbeck, A. Pekdeger, D. Schenk, und J. Schröter. 1984. Untersuchung zur Gruppierung und Definierung von Stoffen hinsichtlich ihres Transportes im Grundwasser im Hinblick auf die Ausweisung von Schutzgebieten für die Grundwassergewinnungsanlagen. Statusbericht und Problemanalyse. Rapport "Wasser 102 02-202/09". Kiel.

Mikesell, M.D., and S.A. Boyd. 1985. Reductive dehalogenation of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T and pentachlorophenol in anaerobic sludges. J. Environ. Qual. 14: 337-340.

Mikesell, M.D., and S.A. Boyd. 1986. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 52: 861-865.

Murthy, N.B.K., D.D. Kaufman, and G.F. Fries. 1979. Degradation of pentachlorophenol (PCP) in aerobic and anaerobic soil. J. Environ. Sci. Health. B14: 1-14.

Neilson, A.H., A.-S. Allard, and M. Remberger. 1985. Biodegradation and transformation of recalcitrant compounds. In O. Hutzinger (ed.) The Handbook of environmental chemistry, Vol. 2C. Springer-Verlag, Berlin.

Scheunert, I. 1987. Behaviour of <sup>14</sup>C-labelled organic industrial chemicals in soil and leached water. In W. van Duijvenbooden and H.G. van Waageningh (eds.) Vulnerability of soil and groundwater to pollutants. Proceedings and Information No. 38, TNO Committee on Hydrological Research, The Hague.

Scheunert, I., Zhang Qiao, and F. Korte. 1986. Comparative studies of the fate of atrazine-<sup>14</sup>C and pentachlorophenol-<sup>14</sup>C in various laboratory and outdoor soil-plant systems. J. Environ. Sci. Health. B21: 457-485.

Schwarzenbach, R.P., and J. Westall. 1981. Transport of non-polar organic industrial chemicals from surface water to ground water. J. Environ. Sci. Technol. 15: 1360-1367.

Smith, J.A., and J.T. Novak. 1987. Biodegradation of chlorinated phenols in subsurface soils. Water Air Soil Poll. 33: 29-42.

- Steiert, J.G., and R.L. Crawford. 1985. Microbial degradation of chlorinated phenols. Trends Biotechnol. 3: 300-305.
- Trevors, J.T. 1982. Effect of temperature on the degradation of pentachlorophenol by *Pseudomonas* species. Chemosphere. 11: 471-475.
- Tyler, J.E., and R.K. Finn. 1974. Growth rates of a pseudomonad on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol. Appl. Microbiol. 28: 181-184.
- Ugland, K., E. Lundales, T. Greibokk, and A. Bjorseth. 1981. Determination of chlorinated phenols by HPLC. J. Chromatogr. 213: 83-90.
- Valo, R., and M. Salkinoja-Salonen. 1986. Bioreclamation of chlorophenol-contaminated soil by composting. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 68-75.
- Valo, R., V. Kitunen, M. Salkinoja-Salonen, and S. Räsänen. 1984. Chlorinated phenols as contaminants of soil and water in the vicinity of two Finnish sawmills. Chemosphere. 13: 835-844.
- Valo, R., J. Apajalahti, and M. Salkinoja-Salonen. 1985. Studies on the physiology of microbial degradation of pentachlorophenol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 313-319.
- Velde, S.T. van der. 1987. Onderzoek naar een geschikte analysemethode voor chloorfenolen in grond. Stageverslag. RIVM, Bilthoven.
- Verschueren, K. 1983. Handbook of environmental data on organic chemicals. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Vonk, J.W., A.O. Hanstveit, D. Barug, and D.M.M. Adema. 1981. Milieutoxicologisch onderzoek van gechloreerde fenolen. TNO rapport CL 81/34, MT-TNO, Delft.
- Wegman, R.C.C., and A.W.M. Hofstee. 1979. Chlorophenols in surface waters in the Netherlands (1976-77). Water Res. 13: 651-657.
- Wegman, R.C.C., and H.H. Broek, van den. 1983. Chlorophenols in river sediments in the Netherlands. Water Res. 17: 227-230.
- Weiss, U.M., I. Scheunert, W. Klein, and F. Korte. 1982. Fate of pentachlorophenol-<sup>14</sup>C in soil under controlled conditions. J. Agric. Food Chem. 30: 1191-1194.
- Xie, T.M., and D. Dyrssen. 1984. Simultaneous determination of partition coefficients and acidity constants of chlorinated phenols and guaiacols by gaschromatography. Anal. Chim. Acta. 160: 21-30.

Bijlage 1. Analysemethode chloorfenolen in grond-en (grond)water.

	Werkwijze A. [1e afbr.experiment]	Werkwijze B. [2e afbr.experiment]
Hoeveelheid grond:	1.5 g	20 g
	in: centrifuge buis (10 ml) met ingeslepen stop	infuusflesje (100 ml) met cap
Toevoegen:	7,5 ml bidest 0,5 g borax	20 ml boraxoplossing 35 g/l, tweemaal uitgeschud met petroleumether
	-----10 min. schudden (schudmachine)-----	
	-----1 uur in ultrasoon bad-----	
Toevoegen:	270 ul azijnzuuranhydride	900 ul azijnzuuranhydride, tweemaal gedestilleerd
Toevoegen:	1.5 ml petroleumether	20 ml petroleumether
Toevoegen:		400 ul oplossing van PCB44 en PCB155 in petroleumether (als interne standaard)
	-----10 min. schudden (schudmachine)-----	
		deel van petroleumether- fase overgieten in centrifugebuis (10 ml) met ingeslepen stop
	-----20 min. centrifugeren (3000 rpm)-----	
In monsterflesje:	1 ml PE fase	100 ul PE fase + 900 ul PE

GC-analyse tegen standaardoplossing met PCB44 en PCB155 in petroleumether.

Waar in de tweede afbraakproef watermonsters werden geanalyseerd, werd dezelfde werkwijze als voor grond gehanteerd, met dien verstande dat de 20 gram grond werd vervangen door 20 ml watermonster.

Vervolg bijlage 1.

Gaschromatografische condities en kolommen

Chloorfenolen werden geanalyseerd met een HP 5890-gaschromatograaf met een capillaire kolom (CPSil 8 CB; 50 m, diameter 0.33 mm,  $d_f$  0.36  $\mu$ m) en een electronenvangst-detector. Als dragergas werd helium gebruikt; en Ar/5% CH<sub>4</sub> werd gebruikt als make-up gas. Het injectievolume was 1  $\mu$ l (splitloos geïnjecteerd). Temperatuurprogramma: starttemperatuur 80 °C, oplopend met 3 °/min naar 290 °C.

De detectiegrenzen van chloorfenolen bij deze methode zijn experimenteel bepaald:

3-monochloorfenol	29.3 $\mu$ g/kg grond (29.3 $\mu$ g/l water)
4-monochloorfenol	169.3 $\mu$ g/kg grond
3,4-dichloorfenol	3.4 $\mu$ g/kg grond
2,4,5-trichloorfenol	0.4 $\mu$ g/kg grond
2,3,4,6-tetrachloorfenol	<0.1 $\mu$ g/kg grond
pentachloorfenol	0.2 $\mu$ g/kg grond.

Bijlage 2. De gemeten concentraties chloorfenolen in de grond [mg/kg] vóór en na het le afbraakexperiment als functie van de incubatieduur. De (niet gecorrigeerde) gegevens zijn gerangschikt naar bodemtype (PZ: podzol, ZK: zeekelei, EG: eerdgrond) en tevens staan de incubatiecondities aangegeven (NS: niet steriel, S: steriel, A: aerob, AN: anaerob).

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
<b>PZ-NS-A</b>							<b>ZK-NS-A</b>						
0	780	740	185	80	40	0	0	980	730	285	120	60	0
0	730	590	125	75	35	0	0	880	650	225	95	50	0
1	425	640	161	80	31	31.8	1	393	223	154	70	26	27.7
1	498	678	187	82	33	29.5	1	453	269	177	89	33	32.4
3	288	398	167	74	33	34.5	3	284	0	128	84	30	37.2
3	305	288	237	109	46	50	3	117	0	113	72	24	23.2
30	0	0	0	0	0	0	30	56	0	0	15	6	5.3
30	0	0	0	0	0	0	30	35	0	2	10	3	3.1
77	0	78	1	0	0	0	77	7	127	0	14	2	1
77	32	170	0	16	6	12	77	0	0	1	8	1	1.8
<b>PZ-S-A</b>							<b>ZK-S-A</b>						
0	1000	1130	285	85	60	0	0	1150	1430	280	130	65	0
0	1010	1000	265	80	50	0	0	1370	1740	380	150	75	0
1	1012	1383	215	97	37	37	1	789	937	172	82	28	30.1
1	1324	1782	292	125	51	46.4	1	980	1142	214	88	34	34
3	1377	2021	210	84	45	50	3	1407	2049	229	91	46	52.6
3	1272	1823	287	112	61	77.8	3	1302	1842	224	88	53	52
30	787	1014	195	74	41	47.9	30	672	703	198	84	38	41.2
30	1032	1495	273	94	47	52.1	30	698	900	201	94	41	45.8
77	813	1173	174	81	39	51.2	77	211	233	145	32	9	13.3
77	929	1045	230	118	41	45.6	77	12	0	86	48	11	13.6
<b>PZ-NS-AN</b>							<b>ZK-NS-AN</b>						
0	700	510	165	75	35	0	0	800	550	185	90	40	0
0	920	610	265	95	40	0	0	910	590	235	100	45	0
1	417	650	141	75	32	34.9	1	409	213	155	74	25	
1	389	807	159	96	32	32.2	1	453	306	148	66	26	23.2
3	468	370	103	47	18	19.3	3	194	0	155	92	34	42.4
3	0	0	0	0	0	0	3	0	27	124	90	32	39.6
30	0	0	0	0	0	0	30	38	0	3	22	8	8.5
30	0	0	0	0	0	0	30	139	0	117	61	19	28.6
77	0	0	0	0	0	0.3	77	28	127	0	15	3	1.8
77	130	502	0	13	5	8.7	77	12	0	96	63	23	23.1
<b>PZ-S-AN</b>							<b>ZK-S-AN</b>						
0	720	710	165	55	15	0	0	1260	1360	315	140	70	0
0	1060	1110	255	80	45	0	0	1260	1570	325	135	65	0
1	988	1364	220	93	37	35	1	996	1169	224	95	36	35.1
1	1340	1754	281	120	48	48.5	1	1130	1281	244	99	37	34.1
3	1401	2125	212	76	42	59.2	3	1290	1893	234	93	46	55.1
3	1235	1753	220	82	43	53	3	1311	1877	250	97	47	27.3
30	773	1185	246	91	65	79.1	30	248	0	184	88	36	45.4
30	959	1353	250	85	46	52.9	30	717	1038	188	93	39	45.9
77	666	926	157	72	34	41.8	77	0	120	0	35	8	12.9
77	0	0	0	0	0	0	77	0	0	75	77	26	33.7

Vervolg bijlage 2.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta
EG-NS-A						
0	1030	1110	285	110	60	0
0	1330	1340	355	145	70	0
1	668	538	197	88	31	28.1
1	806	659	262	119	49	50.3
3	782	572	185	80	30	37.4
3	626	346	179	78	28	35.2
30	44	0	8	49	14	28.6
30	38	0	12	58	15	33.8
77	7	141	0	26	7	18.2
77	0	0	2	19	4	12.6
EG-S-A						
0	950	940	210	90	35	0
0	1050	1050	205	70	35	0
1	931	1299	180	129	108	
1	915	1142	189	75	32	32.4
3	1447	2045	239	83	43	52.9
3	1574	2062	328	115	63	83
30	870	1217	235	83	46	47.9
30	945	1352	295	142	61	69.1
77	0	134	56	16	6	35
77	785	801	181	86	27	27.3
EG-NS-AN						
0	1090	1060	300	110	60	0
0	1030	950	250	110	60	0
1	619	557	166	85	29	32.1
1	1202	1104	327	152	63	71.8
3	984	1224	217	90	34	41.3
3	1272	1617	286	120	42	44.7
30	83	0	82	62	23	29.3
30	0	0	0	0	0	0
77	21	156	0	53	24	36.6
77	0	0	15	64	17	20.9
EG-S-AN						
0	1020	1040	205	100	45	0
0	1090	1090	235	75	45	0
1	1397	1828	296	138	53	45.5
1	1356	1680	290	116	51	49.6
3	1626	2362	306	106	59	73.2
3	0	0	0	0	0	0
30	973	1397	250	85	48	54.5
30	0	0	0	0	0	0
77	1120	1371	247	107	58	80.5
77	0	0	0	0	0	0

Bijlage 3. De gemeten concentraties chloorfenolen in de grond [mg/kg] van het 2e afbraakexperiment als functie van de incubatieduur. De (niet gecorrigeerde) gegevens zijn gerangschikt naar bodemtype (DZ: duinzand, ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond) en tevens staan de incubatiecondities aangegeven (NS: niet-steriel, S: steriel, A: aerob, AN: anaerob).

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
DZ-NS-A							DZ-NS-AN						
0	645	681	207	84	49	7	0						
0	694	714	200	85	49	7	0	747	766	223	92	54	7
0	710	733	220	90	54	8	0	903	934	274	108	59	8
3	675	522	197	85	51	6	3	638	545	204	85	50	7
3	644	542		84	51	6	3	729	576	207	89	52	7
3	728	620	208	88	53	6	3	766	649		102	57	7
10		0	221	97	84	8	10	949		235	112	74	7
10	555	311	185	72	40	3	10		0	207	89	87	11
10	856		204	100	59	4	10	620	354	193	75	44	3
20	527	0	172	66	11	0	20	622	0	160	72	23	0
20	326	0	160	66	11	0	20	856	0	248	98	37	1
20	0	0	120	47	4	0	20	613	0	170	79	23	0
30	0	0	60	19	0	0	30	441	0	104	31	2	0
30	0	0	73	19	0	0	30	0	0	61	17	0	0
30	0	0	55	15	0	0	30						
40	0	0	0	0	0	0	40	0	0	82	12	0	0
40	0	0	0	0	0	0	40	0	0	90	16	0	0
40	0	0	33	10	0	0	40	0	0	44	9	0	0
60	0	0	18	11	1	0	60	0	0	46	11	0	0
60	0	0	15	7	0	0	60	1698	0	70	12	1	0
60	0	0	13	6	0	0	60	65	0	45	6	0	0
DZ-S-A							DZ-S-AN						
0	762	908	227	94	54	7	0	912	958	284	109	60	8
0	250		79	52	41	7	0	366	289	115	62	42	7
0	686	713	195	82	48	7	0	919	958	280	112	62	8
3	917	983		109	62	9	3	788	831	230	97	57	8
3	728	758		86	51	7	3						
3	719	754	202	86	52	7	3	885	935		110	63	9
10	698	738	206	83	51	7	10	569	634	176	74	47	7
10	577	658	186	70	44	7	10	838	881	258	104	61	9
10	640	688	203	80	49	7	10	644	674	191	80	48	7
20	1091		248	100	63	9	20	765		197	96	59	8
20	502		158	85	54	8	20	844	716	207	99	62	8
20	1112	1150	229	103	66	9	20	692		186	92	56	8
30	853		198	90	60	8	30	894	1158	164	79	52	7
30	943	1096	155	67	50	7	30	819			341	158	15
30	668	764	164	84	51	7	30						
40	628		228	121	76	14	40	522		199	114	72	13
40	754		206	93	76	13	40	610		221	121	80	15
40	605		231	105	72	12	40	651		208	109	77	14
60	975	1099	236	112	74	10	60	1033	1123	278	156	93	12
60	1069	1199	253	119	84	11	60	912	964	237	127	76	10
60	976	1075	240	119	78	11	60	955	1156	248	136	82	11

Vervolg bijlage 3.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
<b>ZK-NS-A</b>							<b>ZK-NS-AN</b>						
0	366	0	131	61	31	3	0	282	0	97	50	24	2
0	404	0	134	64	29	3	0	353	0	189	54	28	3
0							0	260	0	81	47	26	2
3	72	0	131	70	31	2	3				78	35	3
3							3	229	0		80	37	3
3	139	0		65	29	2	3	181	48	113	56	28	3
10	0	0	31	28	6	0	10	0	0	149	56		
10	0	0	64	29	51	9	10	0	0	76	43	44	6
10	0	0	24	31	6	0	10	0	0	81	42	15	2
20	0	0	0	13	5	1	20	0	0		12	3	0
20	0	0	0	10	3	0	20	0	0	43	32	10	1
20	0	0	0	15	7	1	20	0	0	27	25	10	2
30	0	0	0	11	5	0	30	0	0	0	21	7	1
30	0	0	0	0	0	0	30	0	0	28	18	7	1
30	0	0	0	4	1	0	30	0	0	0	84	0	0
40							40	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	40	0	0	21	24	11	3
40	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	14	6	1
60	0	0	2	6	2	0	60	0	0	35	58	16	2
60	0	0	1	5	2	0	60	0	0	40	57	17	2
60	0	0	0	5	2	0	60	0	0	0	5	2	0
<b>ZK-S-A</b>							<b>ZK-S-AN</b>						
0	571	569		79	39	4	0	785	779	211	92	44	4
0	556	563	143	75	38	3	0	415	439	107	55	23	2
0	514	520	140	72	42	5	0	526		146	70	36	4
3	1025	1004		125	63	7	3	756	762	202	93	48	5
3	759	841		105	56	6	3	737	752	211	91	46	5
3	890	787		112	50	7	3	813	879		101	52	5
10	400	370	100	52	27	2	10	556	571	153	72	33	3
10	611	604	162	74	38	4	10	627		148	74	47	5
10	760	227		96	371	1	10	709	695	188	82	40	4
20	997	189		105	57	6	20			104	70	42	5
20	906	183		104	58	6	20	761	666	164	97	53	6
20	895	174		104	58	6	20	726		18	90	49	5
30	576	775	103	66	35	4	30	960	1008	185	103	53	6
30	779	844	135	64	41	4	30	826	970	136	80	43	4
30	888	901	209	122	64	6	30	833	934	128	81	41	4
40	562	150		107	55	6	40	422		106	89	44	5
40	406	96		86	40	4	40	541		150	110	55	7
40	90			72	35	4	40	391		115	89	44	5
60	656	1206	148	104	53	5	60	806	1477	196	123	64	6
60	932	1665	234	146	80	9	60	822	1425	190	123	63	6
60	831	1397	176	119	61	6	60	739	1551	165	112	57	5



Vervolg bijlage 3.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
PZ-NS-A							PZ-NS-AN						
0	673	535	200	95	55	7	0	560	426		91	41	4
0	522	393	16	81	45	5	0	605	532	193	88	45	5
0							0	707	659	216	101	57	7
3	454	0	155	80	45	6	3	673	0		107	58	7
3	499	53	161	80	43	5	3	586	0		98	52	7
3	487	0	188	91	50	6	3	606	0		102	56	7
10	0	0	99	72	40	4	10			209			
10							10	0	0	125	94	52	6
10	0	0	86	58	34	5	10	23	0	100	61	31	4
20							20	0	0	61	74	44	5
20	0	0	11	39	27	3	20	0	0	0	23	21	3
20	0	0	23	54	29	3	20	0	0	13	29	24	3
30	0	0	0	26	22	3	30	0	0	0	13	19	2
30	0	0	0	26	22	3	30	0	0	0	17	21	3
30	0	0	0	29	24	3	30	0	0	0	24	23	4
40	0	0	0	0	12	3	40	0	0	0	10	19	4
40	0	0	0	21	16	2	40	0	0	0	21	18	3
40	0	0	0	0	12	1	40	0	0	0	18	20	5
60	0	0	3	10	11	2	60	0	0	3	10	16	3
60	0	0	7	15	14	3	60	0	0	2	8	14	3
60	0	0	0	15	15	2	60	0	0	8	16	13	3
PZ-S-A							PZ-S-AN						
0	865	943	254	109	64	8	0	983	1074	298	117	61	7
0	1063	1159	308	127	70	9	0	1044	1061	303	120	64	8
0	1005	1078	295	125	73	9	0	767	806	226	98	56	7
3	893	971	259	110	63	8	3	960	1015		119	67	9
3	878	931	246	108	65	9	3	851	926		100	63	8
3	627	685	196	86	52	7	3	825	884	218	96	57	7
10	949	1019	261	114	63	8	10	1310	1405	286	142	92	11
10	974	1048	286	118	67	8	10	869	935	258	107	63	8
10	803	855	252	107	62	0	10						
20	659	935	216	107	60	8	20						
20	1000		238	125	74	9	20	941	1124	235	114	70	9
20	428		122	77	50	7	20	867	834	208	109	64	9
30	1071	1355	178	91	54	7	30	666		26	95	56	7
30	847	914	237	125	72	9	30	694	1177	228	176	48	8
30	957	1177	182	95	58	7	30	1033	1292	176	92	56	1
40	853		248	142	81	15	40	623		207	123	71	12
40	798		247	147	85	17	40	718		227	138	79	15
40	702		236	146	87	15	40	727		253	150	88	17
60	907	1159	229	133	82	11	60	913	1120	239	137	82	11
60	944	1257	247	145	86	11	60	884	1176	228	134	81	11
60	931	1185	230	130	76	10	60	922	1198	252	150	93	11

Vervolg bijlage 3.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
EG-NS-A													
0	449	0	135	69	39	5	0	331		175	42	25	2
0	441	345	136	62	34	4	0	302		101	57	35	5
0	405	0	127	61	33	4	0	452		150	76	47	6
3	431	0		75	41	5	3	538	268	202	95	50	6
3	482	0	184	87	46	6	3	466	261	157	75	41	5
3	465	0	199	95	50	6	3	545	284		98	53	6
10	0	0	125	71	43	6	10	0	0	114	63	32	4
10							10	0	0	177	111	61	7
10	0	0	112	59	19	4	10	0	0	124	66	33	5
20	0	0	0	39	14	2	20	0	0	26	46	16	2
20	0	0	0	41	14	2	20	0	0	48	52	19	3
20	0	0	14	48	16	2	20	0	0	74	60	25	3
30	0	0	0	30	12	2	30	0	0	65	67	28	4
30							30	0	0	19	39	15	2
30	0	0	0	26	11	2	30	0	0	41	54	23	3
40	0	0	0	19	9	2	40	0	0	0	27	13	3
40	0	0	0	0	10	2	40	0	0	24	41	17	3
40	0	0	0	24	11	2	40	0	0	0	26	12	2
60	0	0	2	16	8	1	60	16	0	41	39	14	2
60	0	0	3	18	9	1	60	0	0	1	15	8	1
60	0	0	3	20	11	2	60	0	0	36	34	14	2
EG-S-A													
0	572	583	142	60	34	3	0	1003	1107	272	119	75	8
0	629	668	168	70	43	4	0	737	815	197	87	53	5
0	472	486	132	59	33	3	0	754	845	202	85	51	5
3	846	934	230	104	62	7	3	905	937	242	107	62	7
3	677	703		75	45	5	3	816	813		93	56	7
3	915	951	255	111	63	7	3	992	1031		118	68	7
10	1563	1600	357	174	117	13	10	861	871	231	103	65	8
10							10	1103		236	106	90	10
10	1357	1168	295	149	101	10	10	846	885	172	89	56	5
20	931		229	124	78	8	20	629		138	75	45	5
20	1220	1151	276	141	92	10	20	656		148	78	46	5
20	1312	1110	248	129	73	7	20			201	113	75	9
30	533		123	77	46	5	30			181	102	55	6
30	592		153	89	53	6	30	615		145	89	54	6
30	602		138	86	57	6	30			191	103	57	6
40	707		198	126	76	12	40	597		201	127	76	12
40	509		198	129	76	12	40	542		184	122	72	11
40	520		188	125	72	12	40	570		172	116	66	11
60	645	2244	153	100	63	6	60	719	2028	159	102	63	6
60	814	2229	209	129	79	8	60	650	1866	159	102	62	6
60	800	2350	185	116	76	7	60	764	2285	195	123	78	7
EG-S-AN													
0							0	1003	1107	272	119	75	8
0							0	737	815	197	87	53	5
0							0	754	845	202	85	51	5
3							3	905	937	242	107	62	7
3							3	816	813		93	56	7
3							3	992	1031		118	68	7
10							10	861	871	231	103	65	8
10							10	1103		236	106	90	10
10							10	846	885	172	89	56	5
20							20	629		138	75	45	5
20							20	656		148	78	46	5
20							20			201	113	75	9
30							30			181	102	55	6
30							30	615		145	89	54	6
30							30			191	103	57	6
40							40	597		201	127	76	12
40							40	542		184	122	72	11
40							40	570		172	116	66	11
60							60	719	2028	159	102	63	6
60							60	650	1866	159	102	62	6
60							60	764	2285	195	123	78	7

Bijlage 4. De gemeten concentraties chloorfenolen in de grond [mg/kg]

van het le afbraakexperiment als functie van de incubatieduur. De (gecorrigeerde) gegevens zijn gerangschikt naar bodemtype (PZ: podzol, ZK: zeeklei, EG: eerdgrond) en tevens staan de incubatiecondities aangegeven (NS: niet steriel, S: steriel, A: aerob, AN: anaerob). De aanduiding -1 betekent dat geen gegevens beschikbaar zijn.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
<b>PZ-NS-A</b>							<b>ZK-NS-A</b>						
0	780	740	185	80	40	-1	0	980	730	285	120	60	-1
0	730	590	125	75	35	-1	0	880	650	225	95	50	-1
1	425	640	161	80	31	31.8	1	393	223	154	70	26	27.7
1	498	678	187	82	33	29.5	1	453	269	177	89	33	32.4
3	288	398	167	74	33	34.5	3	284	190	128	84	30	37.2
3	305	288	237	109	46	50	3	117	150	113	72	24	23.2
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1	30	56	0	4	15	6	5.3
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1	30	35	0	2	10	3	3.1
77	30	78	1	1	1	0.2	77	7	-1	4	14	2	1
77	32	170	4	16	6	12	77	30	0	1	8	1	1.8
<b>PZ-S-A</b>							<b>ZK-S-A</b>						
0	1000	1130	285	85	60	-1	0	1150	1430	280	130	65	-1
0	1010	1000	265	80	50	-1	0	1370	1740	380	150	75	-1
1	1012	1383	215	97	37	37	1	789	937	172	82	28	30.1
1	1324	-1	292	125	51	46.4	1	980	1142	214	88	34	34
3	1377	-1	210	84	45	50	3	-1	-1	229	91	46	52.6
3	1272	-1	287	112	61	77.8	3	-1	-1	224	88	53	52
30	787	1014	195	74	41	47.9	30	672	703	198	84	38	41.2
30	1032	1495	273	94	47	52.1	30	698	900	201	94	41	45.8
77	813	1173	174	81	39	51.2	77	211	233	145	32	9	13.3
77	929	1045	230	118	41	45.6	77	12	0	86	48	11	13.6
<b>PZ-NS-AN</b>							<b>ZK-NS-AN</b>						
0	700	510	165	75	35	-1	0	800	550	185	90	40	-1
0	920	610	265	95	40	-1	0	910	590	235	100	45	-1
1	417	650	141	75	32	34.9	1	409	213	155	74	25	-1
1	389	807	159	96	32	32.2	1	453	306	148	66	26	23.2
3	468	370	103	47	18	19.3	3	194	170	155	92	34	42.4
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3	-1	27	124	90	32	39.6
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1	30	38	0	3	22	8	8.5
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1	30	139	0	117	61	19	28.6
77	30	170	5	1	1	0.3	77	28	-1	4	15	3	1.8
77	130	-1	3	13	5	8.7	77	12	0	96	63	23	23.1
<b>PZ-S-AN</b>							<b>ZK-S-AN</b>						
0	720	710	165	55	15	-1	0	1260	1360	315	140	70	-1
0	1060	1110	255	80	45	-1	0	1260	1570	325	135	65	-1
1	988	1364	220	93	37	35	1	996	1169	224	95	36	35.1
1	-1	-1	281	120	48	48.5	1	1130	1281	244	99	37	34.1
3	-1	-1	212	76	42	59.2	3	1290	-1	234	93	46	55.1
3	-1	-1	220	82	43	53	3	1311	-1	250	97	47	27.3
30	773	1185	246	91	65	79.1	30	248	-1	184	88	36	45.4
30	959	1353	250	85	46	52.9	30	717	1038	188	93	39	45.9
77	666	926	157	72	34	41.8	77	25	120	4	35	8	12.9
77	-1	-1	-1	-1	-1	-1	77	35	3170	75	77	26	33.7

Vervolg bijlage 4.

tijd concentraties chloorfenol [mg/kg]  
[d] 3m 4m di tri tetra penta

EG-NS-A

0	1030	1110	285	110	60	-1
0	1330	1340	355	145	70	-1
1	668	538	197	88	31	28.1
1	806	659	262	119	49	50.3
3	782	572	185	80	30	37.4
3	626	346	179	78	28	35.2
30	44	190	8	49	14	28.6
30	38	150	12	58	15	33.8
77	7	141	4	26	7	18.2
77	30	170	2	19	4	12.6

EG-S-A

0	950	940	210	90	35	-1
0	1050	1050	205	70	35	-1
1	931	1299	180	129	108	-1
1	915	1142	189	75	32	32.4
3	-1	-1	239	83	43	52.9
3	-1	-1	328	115	63	83
30	870	1217	235	83	46	47.9
30	945	1352	295	142	61	69.1
77	-1	134	56	16	6	35
77	785	801	181	86	27	27.3

EG-NS-AN

0	1090	1060	300	110	60	-1
0	1030	950	250	110	60	-1
1	619	557	166	85	29	32.1
1	1202	1104	327	152	63	71.8
3	984	1224	217	90	34	41.3
3	1272	1617	286	120	42	44.7
30	83	170	82	62	23	29.3
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1
77	21	156	4	53	24	36.6
77	30	170	15	64	17	20.9

EG-S-AN

0	1020	1040	205	100	45	-1
0	1090	1090	235	75	45	-1
1	-1	-1	296	138	53	45.5
1	-1	-1	290	116	51	49.6
3	-1	-1	306	106	59	73.2
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1
30	973	1397	250	85	48	54.5
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1
77	1120	1371	247	107	58	80.5
77	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Bijlage 5. De gemeten concentraties chloorfenolen in de grond [mg/kg] van het 2e afbraakexperiment als functie van de incubatieduur. De (gecorrigeerde) gegevens zijn gerangschikt naar bodemtype (DZ: duinzand, ZK: zeeklei, PZ: podzol, EG: eerdgrond) en tevens staan de incubatiecondities aangegeven (NS: niet-steriel, S: steriel, A: aerob, AN: anaerob). De aanduiding -1 betekent dat geen gegevens beschikbaar zijn.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
DZ-NS-A							DZ-NS-AN						
0	645	681	207	84	49	7	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
0	694	714	200	85	49	7	0	747	766	223	92	54	7
0	710	733	220	90	54	8	0	903	934	274	108	59	8
3	675	522	197	85	51	6.5	3	638	545	204	85	50	7
3	644	542	-1	84	51	6	3	729	576	207	89	52	6.6
3	728	620	208	88	53	6.5	3	766	649	-1	102	57	7
10	-1	170	221	97	84	8.1	10	949	-1	235	112	74	6.7
10	555	311	185	72	40	2.6	10	-1	170	207	89	87	10.6
10	856	-1	204	100	59	4	10	620	354	193	75	44	3.2
20	527	150	172	66	11	0.1	20	622	170	160	72	23	0.2
20	326	170	160	66	11	0.2	20	856	150	248	98	37	1.3
20	30	190	120	47	14	0.3	20	613	190	170	79	23	0.2
30	25	0	60	19	1	0	30	441	0	104	31	2	0.1
30	30	0	73	19	2	0	30	30	0	61	17	1	0.2
30	35	0	55	15	0	0	30	-1	-1	-1	-1	-1	0.3
40	0	-1	3	1	0	-1	40	30	-1	82	12	1	0
40	0	-1	5	2	0	-1	40	25	-1	90	16	2	0
40	0	-1	33	10	0	-1	40	35	-1	44	9	0	0
60	-1	-1	18	11	-1	0.2	60	0	-1	46	11	0	0.1
60	-1	-1	15	7	-1	0.1	60	-1	-1	70	12	1	0.2
60	-1	-1	13	6	-1	0.1	60	-1	-1	45	6	0	0.1
DZ-S-A							DZ-S-AN						
0	762	809	227	94	54	7	0	912	958	284	109	60	8
0	-1	-1	-1	-1	41	7	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
0	686	713	195	82	48	7	0	919	958	280	112	62	8
3	917	983	-1	109	62	9	3	788	831	230	97	57	7.8
3	728	758	-1	86	51	7	3	-1	-1	-1	-1	-1	-1
3	719	754	202	86	52	7	3	885	935	-1	110	63	9
10	698	738	206	83	51	7.4	10	569	634	176	74	47	7.3
10	577	658	186	70	44	6.5	10	838	881	258	104	61	8.7
10	640	688	203	80	49	7.1	10	644	674	191	80	48	7.3
20	1091	-1	248	100	63	9	20	765	-1	197	96	59	7.9
20	502	-1	158	85	54	8.4	20	844	716	207	99	62	8.4
20	1112	1150	229	103	66	8.9	20	692	-1	186	92	56	7.9
30	853	-1	198	90	60	8.4	30	894	1158	164	79	52	7
30	843	1096	155	67	50	6.8	30	-1	-1	-1	-1	-1	-1
30	668	764	164	84	51	7.2	30	-1	-1	-1	-1	-1	-1
40	628	-1	228	121	76	13.6	40	522	-1	199	114	72	13.1
40	754	-1	206	93	76	12.9	40	610	-1	221	121	80	15.1
40	605	-1	231	105	72	12.1	40	651	-1	208	109	77	14.1
60	975	1099	236	112	74	10	60	1033	1123	278	156	93	12
60	1069	1199	253	119	84	11	60	912	964	237	127	76	10
60	976	1075	240	119	78	11	60	955	1156	248	136	82	11

Vervolg bijlage 5.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
ZK-NS-A							ZK-NS-AN						
0	366	0	131	61	31	3	0	282	0	97	50	24	2
0	404	0	134	64	29	3	0	353	0	119	54	28	3
0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	260	0	81	47	26	2
3	72	-1	131	70	31	2.3	3	-1	-1	-1	78	35	3
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3	229	-1	-1	80	37	3
3	139	-1	-1	65	29	2	3	181	-1	113	56	28	2.7
10	35	-1	31	28	6	0.4	10	30	-1	149	56	-1	-1
10	30	-1	64	29	-1	8.6	10	25	-1	76	43	44	6.5
10	25	-1	24	31	6	0.5	10	35	-1	81	42	15	1.6
20	0	-1	3	13	5	1	20	0	-1	-1	12	3	0.4
20	0	-1	4	10	3	0.2	20	0	-1	43	32	10	1.3
20	0	-1	5	15	7	0.9	20	0	-1	27	25	10	1.5
30	-1	-1	0	11	5	0.5	30	-1	-1	3	21	7	1.1
30	-1	-1	0	1	1	0.2	30	-1	-1	28	18	7	0.9
30	-1	-1	0	4	1	0.1	30	-1	-1	5	-1	1	0.2
40	-1	-1	-1	-1	-1	-1	40	-1	-1	3	1	1	0.2
40	-1	-1	-1	1	1	0.2	40	-1	-1	21	24	11	2.7
40	-1	-1	-1	2	2	0.1	40	-1	-1	5	14	6	0.8
60	-1	-1	-1	-1	2	0	60	-1	-1	-1	-1	-1	2
60	-1	-1	-1	0	2	0	60	-1	-1	-1	-1	-1	2
60	-1	-1	-1	0	2	0	60	-1	-1	4	-1	-1	0.2
ZK-S-A							ZK-S-AN						
0	571	569	-1	79	39	4	0	785	779	211	92	44	4
0	556	563	143	75	38	3	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
0	514	520	140	72	42	5	0	526	-1	146	70	36	4
3	1025	1004	-1	125	63	7	3	756	762	202	93	48	5.5
3	759	841	-1	105	56	6	3	737	752	211	91	46	5
3	890	787	-1	112	50	7	3	813	879	-1	101	52	5
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10	556	571	153	72	33	3.3
10	611	604	162	74	38	3.7	10	627	-1	148	74	47	5.4
10	760	-1	227	96	-1	-1	10	709	695	188	82	40	4
20	997	-1	189	105	57	5.8	20	-1	-1	104	70	42	4.7
20	906	-1	183	104	58	6.3	20	761	666	164	97	53	5.8
20	895	-1	174	104	58	6	20	726	-1	-1	90	49	5
30	576	775	103	166	35	3.6	30	960	1008	185	103	53	5.5
30	779	844	135	64	41	4.3	30	826	970	136	80	43	4.3
30	888	901	209	122	64	6.4	30	833	934	128	81	41	3.7
40	562	-1	150	107	55	6.4	40	422	-1	106	89	44	4.8
40	406	-1	96	86	40	3.9	40	541	-1	150	110	55	7
40	-1	-1	90	72	35	3.9	40	391	-1	115	89	44	5.2
60	656	1206	148	104	53	4.6	60	806	1477	196	123	64	6
60	932	1665	234	146	80	9	60	822	1425	190	123	63	6
60	831	1397	176	119	61	6	60	739	1551	165	112	57	5

Vervolg bijlage 5.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
PZ-NS-A							PZ-NS-AN						
0	673	535	200	95	55	7	0	560	426	-1	91	41	4
0	522	393	-1	81	45	5	0	605	532	193	88	45	5
0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	707	659	216	101	57	7
3	454	190	155	80	45	5.9	3	673	190	-1	107	58	7
3	499	53	161	80	43	5.2	3	586	170	-1	98	52	7
3	487	150	188	91	50	6	3	606	150	-1	102	56	7
10	25	190	99	72	40	4	10	-1	-1	209	-1	-1	-1
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10	30	0	125	94	52	6.1
10	35	150	86	58	34	4.7	10	23	0	100	61	31	3.6
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	20	30	-1	61	74	44	5.3
20	0	0	11	39	27	3.2	20	25	-1	4	23	21	3.2
20	0	0	23	54	29	3.4	20	35	-1	13	29	24	3.1
30	-1	-1	3	26	22	3.3	30	0	-1	3	13	19	2.4
30	-1	-1	4	26	22	3.3	30	0	-1	5	17	21	2.8
30	-1	-1	5	29	24	3	30	0	-1	4	24	23	3.7
40	-1	-1	0	1	12	2.6	40	-1	-1	0	10	19	3.7
40	-1	-1	0	21	16	2.3	40	-1	-1	0	21	18	3.3
40	-1	-1	0	2	12	1.1	40	-1	-1	0	18	20	4.7
60	-1	-1	-1	10	11	2	60	-1	-1	-1	10	16	3
60	-1	-1	-1	15	14	3	60	-1	-1	-1	8	14	3
60	-1	-1	-1	15	15	2	60	-1	-1	-1	16	13	3
PZ-S-A							PZ-S-AN						
0	865	943	1254	109	64	8	0	983	1074	298	117	61	7
0	1063	1159	308	127	70	9	0	1044	1061	303	120	64	8
0	1005	1078	295	125	73	9	0	767	806	226	98	56	7
3	893	971	259	110	63	8	3	960	1015	-1	119	67	9
3	878	931	246	108	65	8.6	3	851	926	-1	100	63	8
3	627	685	196	86	52	7	3	825	884	218	96	57	7.2
10	949	1019	261	114	63	7.6	10	1167	1252	255	126	82	9.9
10	974	1048	286	118	67	8.4	10	869	935	258	107	63	8.4
10	803	855	252	107	62	-1	10	-1	-1	-1	-1	-1	-1
20	659	935	216	107	60	7.8	20	-1	-1	-1	-1	-1	-1
20	1000	-1	238	125	74	9.1	20	941	1124	235	114	70	8.9
20	428	-1	-1	-1	-1	7	20	867	834	208	109	64	8.9
30	1071	1355	178	91	54	6.6	30	666	-1	-1	95	56	7.3
30	847	914	237	125	72	9.5	30	694	1177	228	-1	48	8
30	957	1177	182	95	58	7.2	30	1033	1292	176	92	56	7
40	853	-1	248	142	81	15.3	40	623	-1	207	123	71	12.5
40	798	-1	247	147	85	17	40	718	-1	227	138	79	15.2
40	702	-1	236	146	87	15.2	40	727	-1	253	150	88	17.2
60	907	1159	229	133	82	11	60	913	1120	239	137	82	11
60	944	1257	247	145	86	11	60	884	1176	228	134	81	11
60	931	1185	230	130	76	10	60	922	1198	252	150	93	11

Vervolg bijlage 5.

tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]						tijd [d]	concentraties chloorfenol [mg/kg]					
	3m	4m	di	tri	tetra	penta		3m	4m	di	tri	tetra	penta
EG-NS-A							EG-NS-AN						
0	449	-1	135	69	39	5	0	331	-1	175	42	25	-1
0	441	345	136	62	34	4	0	302	-1	101	57	35	5
0	405	-1	127	61	33	4	0	452	-1	150	76	47	6
3	431	190	-1	75	41	5	3	538	268	202	95	50	6
3	482	150	184	87	46	6	3	466	261	157	75	41	5
3	465	170	199	95	50	6	3	545	284	98	53	6	3
10	35	0	125	71	43	6	10	25	150	114	63	32	3.8
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10	35	190	143	90	49	5.5
10	25	0	112	59	19	3.7	10	30	170	124	66	33	4.6
20	0	-1	3	39	14	2.2	20	0	0	26	46	16	2.4
20	0	-1	5	41	14	2.2	20	0	0	48	52	19	2.8
20	0	-1	14	48	16	2.4	20	0	0	74	60	25	3
30	-1	-1	5	30	12	1.8	30	-1	-1	65	67	28	3.7
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1	30	-1	-1	19	39	15	2.2
30	-1	-1	3	26	11	1.7	30	-1	-1	41	54	23	3
40	-1	-1	0	19	9	1.8	40	-1	-1	3	27	13	2.7
40	-1	-1	0	1	10	1.9	40	-1	-1	24	41	17	3.1
40	-1	-1	0	24	11	2.4	40	-1	-1	5	26	12	2.2
60	-1	-1	-1	16	8	1	60	-1	-1	41	39	14	2
60	-1	-1	-1	18	9	1.4	60	-1	-1	1	15	8	1
60	-1	-1	-1	20	11	1.8	60	-1	-1	36	34	14	2
EG-S-A							EG-S-AN						
0	572	583	142	60	34	3	0	1003	1107	272	119	75	8
0	629	668	168	70	43	4	0	737	815	197	87	53	5
0	472	486	132	59	33	3	0	754	845	202	85	51	5
3	846	934	230	104	62	7	3	905	937	242	107	62	7
3	677	703	-1	75	45	5	3	816	813	-1	93	56	7
3	915	951	255	111	63	7	3	992	1031	-1	118	68	7
10	1278	1310	292	142	96	10.2	10	861	871	231	103	65	7.5
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10	1103	-1	236	106	90	10.4
10	1174	1010	255	128	88	9	10	846	885	172	89	56	5.4
20	931	-1	229	124	78	7.8	20	629	-1	138	75	45	4.6
20	1045	985	236	120	78	9	20	656	-1	148	78	46	4.8
20	1219	1031	231	120	68	6.6	20	-1	-1	201	113	75	9
30	533	-1	123	77	46	4.8	30	-1	-1	181	102	55	5.8
30	592	-1	153	89	53	5.6	30	615	-1	145	89	54	5.6
30	602	-1	138	86	57	6.1	30	-1	-1	191	103	57	5.7
40	707	-1	198	126	76	12.1	40	597	-1	201	127	76	12.3
40	509	-1	198	129	76	12.2	40	542	-1	184	122	72	11.4
40	520	-1	188	125	72	11.9	40	570	-1	172	116	66	11.1
60	645	2244	153	100	63	6	60	719	2028	159	102	63	6
60	814	2229	209	129	79	8	60	650	1866	159	102	62	6
60	800	2350	185	116	76	7	60	764	2285	195	123	78	7.4



Bijlage 6. De concentraties chloorfenolen [ug/l] in de waterfase als functie van de tijd voor de watermonsters meegenomen in het tweede afbraakexperiment ter controle van de vervluchtiging.

tijd [d]	3-mono [ug/l]	4-mono [ug/l]	3,4-di [ug/l]	2,4,5-tri [ug/l]	2,3,4,6-tetra [ug/l]	penta [ug/l]
0	799	879		81	48	6
0	497	554	4	51	34	5
3	915	1039		119	65	9
3	917	968		100	50	8
10	950	1020	269	99	45	5
10	712	780	210	92	55	8
20	1173	1194	260	148	69	11
20	1418	1455	315	318	159	18
30	687	0	370	369	181	23
30	622	633	264	293	140	16
40	861	974	239	95	59	15
40	739	724	209	105	69	14
60						
60	1631	1879	474	668	312	27