Verslag bodemremediëring

2017

Donja Baetens  
Bram Broothaers  
Gynaika De Coster  
Arne Janssens  
Nele Loenders  
Fatou M’bow  
Evi Pingnet  
Anne van den Oever

Inhoudstabel

[Inleiding 3](#_Toc483321744)

[Omschrijving experimenten 3](#_Toc483321745)

[Extractierendement 3](#_Toc483321746)

[Invloed o2 3](#_Toc483321747)

[Activiteit 3](#_Toc483321748)

[Berekeningen resultaten 3](#_Toc483321749)

[Resultaten 4](#_Toc483321750)

[Extractierendement 4](#_Toc483321751)

[Invloed O2 5](#_Toc483321752)

[Activiteit 5](#_Toc483321753)

[Tips voor vervolgonderzoek 6](#_Toc483321754)

# Inleiding

Tijdens het onderdeel bodemremediëring van het GIP milieutechnologie hebben we 3 experimenten opgezet om de afbraak van RBBR door Laccase in de bodem beter te begrijpen. Het doel van dit verslag is om de belangrijkste resultaten, conclusies en tips voor volgende jaren samen te vatten. Voor details omtrent materialen methoden verwijzen we naar de laboschriften van het academiejaar 2016-2017.

# Omschrijving experimenten

## Extractierendement

Uit de laboschriften van voorgaande jaren kwam naar voren dat bij de extractie van RBBR het resuspenderen in methanol niet altijd gemakkelijk ging. Daarom is besloten om te onderzoeken of er een beter solvent is om in te resuspenderen. We hebben bodem vervuild met een bekende hoeveelheid RBBR. Vervolgens hebben we de extractiemethode uitgevoerd met verschillende solventen en van iedere extractie het extractierendement bepaald. Zo konden we achterhalen met welk solvent het hoogste rendement behaald werd.

## Invloed o2

In voorgaande jaren is getracht te onderzoeken wat de invloed is van een zuurstoftekort op de afbraak van RBBR. Hieruit bleek dat een tekort aan zuurstof de werking van Laccase inhibeerde. Wij wilden weten of toevoegen van extra zuurstof de werking van Laccase zou stimuleren. Daarom hebben we tegelijkertijd twee grote bakken met bodem + Laccase + RBBR opgezet. Iedere bak was verdeeld in 3 compartimenten: één met staal, één met een blanco (zonder RBBR) en één met de referentie (zonder Laccase). Deze bakken hebben we twee weken laten staan. Bak 2 werd iedere dag goed omgeroerd. Zo werd er meer zuurstof in de bodem gebracht. Bak 1 werd met rust gelaten. Na iedere week hebben we hieruit stalen genomen en extracties uitgevoerd.

## Activiteit

We wilden weten hoe lang het enzym actief was. Daarom hebben we vier dagen na de opzet van Bak 1 nog een Bak 3 opgezet met dezelfde concentraties en dezelfde omstandigheden. Hieruit zijn stalen genomen op dezelfde dag als Bak 1. Tabel 1 geeft een overzicht van de 3 bakken en hoeveel stalen genomen zijn. Uiteindelijk hebben we extracties gedaan na 3, 7, 10 en 14 dagen.

# Berekeningen resultaten

Eerst wordt blanco van de OD-waarden van het staal afgetrokken. Daarna worden a.d.h.v. de opgestelde ijklijn deze OD-waarden omgezet naar de eindconcentraties RBBR (g/L). Door deze waarden te vermenigvuldigen met de hoeveelheid solvent waarin opgelost werd (10 mL) en te delen door de exacte massa’s van de stalen, wordt deze concentratie omgezet in g RBBR/g bodem. Deze eindconcentraties worden dan afgetrokken van de beginconcentraties om de uiteindelijke afbraak te bepalen.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Bak | VRIJ 1 | DI 2 | VRIJ 2 | VRIJ 3 | VRIJ 4 |
| ∆t | 1 | IN |  | UIT | UIT | x(3 + 2) |
| 3 |  | IN | UIT | UIT |
| O2 | 2 | IN |  | UIT | UIT |
| Meting |  | \ | \ | \ | Absorbantie VRIJ 2 | Absorbantie VRIJ 3 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | RBBR | Laccase | Bodem |
| ∆t = x | Rep 1 | X | X | X |
| Rep 2 | X | X | X |
| Rep 3 | X | X | X |
| Blanco | O | X | X |
|  | Ref | X | O | X |

Tabel 1 : Overzicht van de opzet van de experimenten

# Resultaten

## Extractierendement

Tabel 2 geeft de resultaten van de bepaling van het extractierendement. Het hoogste rendement wordt behaald met het solventmengsel 50% ethylacetaat, 10% H20, 40% Methanol. Dit solvent is gekozen om mee verder te werken. We raden volgende jaren aan ook dit solvent te gebruiken.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mengsel** | **g bodem staal** | **OD** | **Beginconcentratie (g RBBR/ g bodem)** | **Eindhoeveelheid (g RBBR/ g bodem)** | **ijklijn** | **Rendement** |
| H20/MetOH (70/30) | 7.79 | 0.648 | 0.00015 | 9.13E-05 | 9.212x-0.0073 | 0.61 |
| H20/MetOH (70 /30) | 8.00 | 0.771 | 0.00015 | 1.06E-04 | 9.212x-0.0073 | 0.70 |
| EA/H20/MetOH (50/10/40) | 7.96 | 0.515 | 0.00015 | 1.23E-04 | 5.3005x-0.0045 | **0.82** |
| EA/H20/MetOH (50/10/40) | 7.92 | 0.478 | 0.00015 | 1.15E-04 | 5.3005x-0.0045 | **0.77** |
| MetOH | 7.96 | 0.299 | 0.00015 | 4.88E-05 | 5.7415x+0.0762 | 0.33 |
| MetOH | 8.29 | 0.34 | 0.00015 | 5.54E-05 | 5.7415x+0.0763 | 0.37 |

Tabel 2 : Resultaten extractierendement. EA staat voor ethylacetaat, MetOH voor methanol.

## Invloed O2

De resultaten bij het experiment met extra zuurstof (omroeren) hebben hele grote foutenvlaggen omdat er negatieve waarden voor de afbraak werden bekomen bij sommige replica’s. Hierdoor kan men moeilijk besluiten trekken omtrent deze proef. Aangezien het twee weken op rij ‘toevallig’ bij de bak met extra zuurstof gebeurde, is het vermoedelijk niet gewoon te wijten aan een fout in de extractie (gebeurde steeds door andere personen), maar lagen de gemeten eindconcentraties gewoon zeer dicht bij de beginconcentraties. De negatief verkregen resultaten kan men dus gewoon als geen afbraak beschouwen. Men zou kunnen concluderen dat roeren of meer zuurstof dus zorgt voor minder afbraak. Een plausibelere uitleg is dat de bak waarin geroerd werd altijd boven de andere bakken stond en hierdoor sneller uitdroogde. Dit effect werd versterkt door het omroeren. Een te droge bodem vermindert mogelijk het contact tussen laccase en RBBR. Mogelijk onderzoek voor volgende jaren kan zijn om de activiteit van laccase te bepalen bij verschillende vochtgehaltes. Het is wel duidelijk dat er na een langere tijd (14 dagen) meer afbraak heeft plaatsgevonden.

## Activiteit

Na 3 dagen is er nog geen afbraak. Na 7 dagen zien we wel afbraak en vanaf 10 dagen is de afbraak constant (binnen de standaarddeviaties), dat wil zeggen: er wordt geen RBBR meer afgebroken. We raden dus aan om het experiment niet langer dan 14 dagen te laten duren, omdat het enzym dan niet meer actief is.

Wat opvalt bij zowel het experiment met zuurstof als het activiteit experiment, is dat de referentie altijd hoger ligt dan de stalen. Dit zou betekenen dat de bodem zelf meer afbreekt dan laccase of laccase inhibeert. Dit lijkt erg onwaarschijnlijk, maar binnen dit onderzoek hebben we geen andere verklaringen gevonden. Dit was het eerste jaar dat het experiment op grotere schaal is uitgevoerd, dat wil zeggen in bakken van 250 à 500 g ipv in erlenmeyers met 8 g bodem. We kunnen volgende jaren aanraden om goed na te denken over de opzet van de grotere schaal en er zeker voor te zorgen dat alle compartimenten gelijk zijn.

# Tips voor vervolgonderzoek

1. Men kan het verwijderen van de chloroform met de scheitrechter misschien beter na het centrifugeren doen. Op die manier zit de bodem niet helemaal vermengd met de chloroform en de RBBR en hoeft men niet alle bodem in de scheitrechter te doen (dit leidt vaak tot verstoppen van de scheitrechter). We raden aan om eens te testen hoe de extractiemethode verloopt als men deze twee stappen omdraait. Hiervoor zijn wel glazen buizen nodig i.p.v. plastic falconbuizen omdat chloroform plastic doet ‘smelten’.
2. Indien er geen grote soniceerder beschikbaar is, kan men de bodem best direct afwegen in een erlenmeyer van 50 mL (ipv 100 mL) en daar de verschillende solventen bij doen. Zo geraken er meer dan 2 erlenmeyers tegelijk in de soniceerder.
3. Bij het scheiden met de scheitrechters goed opletten dat er niet mee van de blauwe fase in het kraantje komt/mee eruit want dan is deze druppel kwijt. Het is beter een hele druppel chloroform over te houden die wel zal verdampen dan een halve druppel blauwe fase te verliezen!
4. Maak RBBR en Laccase oplossing geconcentreerd genoeg om je bodem niet in een moeras te veranderen bij het toevoegen. Probeer niet meer dan 100 mL vloeistof per kg bodem toe te voegen. Bovendien zou dezelfde hoeveelheid water moeten toegevoegd worden aan de blanco en referentie, zodat het totaal volume toegevoegde vloeistof steeds gelijk is.
5. Maak al je stalen, referenties en blanco even groot en voeg dan gewoon overal evenveel RBBR en Laccase toe. (Bijvoorbeeld alle stalen 500 g en dan overal 10 mL RBBR-oplossing en 10 mL Laccase aan toevoegen) Dat bespaart berekeningen achteraf.
6. Probeer een manier te verzinnen om water op een constante en homogene manier toe te voegen aan de bodem. De bodem droogt namelijk snel uit. Als men gewoon water over de bodem kapt, dan kan er uitloging plaatsvinden naar de bodem van de bak bij het toevoegen van water.
7. De piek van RBBR verschuift bij afbraak. Hier op letten bij het nemen van de spectra.
8. Beter met “buizen/ringen” werken i.p.v. parafilm om 1 bak op te delen in verschillende compartimenten. Hierdoor kan men ook een “dikkere laag” bekomen waardoor er minder uitdroging optreedt (nu was de bodemlaag vrij dun telkens.)
9. Bij het opzetten van het experiment meteen ook de beginconcentraties meten d.m.v. extracties.