Sneller en goedkoper saneren van vervuilde bodems

met behulp van

Dehalococcoides ethenogenes

Thin-section electron micrographs showing coccoid and elongated cells

Photos courtesy of Dr. Steve Zinder, Cornell University

Sneller en goedkoper saneren van vervuilde bodems

Bron: Chemisch Weekblad, juli 2009

Chloorvreters opjutten

Door: poly-lactaat als slurry aan de vervuilde grond toe te voegen!!!

Volgens het Chemisch Weekblad artikel zouden na jaren inwerking door bacteriën op poly-lactaat eerst waterstof vrij komen en daarna lactaat, waarmee Dehalococcoides de chloorverbindingen af zou breken.

Lactaat, waterstof, de tijd en Dehalococcoides zouden dan de vervuilde bodems selectief schoon maken was de boodschap.

Chloorvreters opjutten

PTS staat voor PER en TRI Saneringen.

Een milieu-firma in Coevorden die binnenkort ook met mijn methode in Nederland aan de slag zal gaan.

Mijn naam is dr G.J.J. Beukeveld,

o.a. uitvinder en staatshouder.

Frequenties van verontreinigingen

Ontchloren met bacteriën?

Anaerobic microbial reductive dechlorination

Dehalobacter, Dehalospirillum, Desulfitobacterium, Desulfomonile, Desulfuromonas, Enterobacter

Dehalococcoides

species:

D. ethenogenes 195
BAV1
FL2
VS
CBDB1

He et al., Nature, 2003

Ontchloren door de bacterie te vertroetelen

Anaërobe Biostimulatie

Biostimulatie	**omstandigheden aanpassen zodat bacteriegroei ontstaat**
Bioaugmentatie	**bacteriën toevoegen zodat extra omzetting ontstaat**
Bioremediatie	**biosysteem herstellen, verbeteren**

Ademhaling van onze bacterie

DNA volgorde Dehalococcoides

```
>gi|57233530|ref|NC_002936.3| Dehalococcoides ethenogenes 195, complete genome
ACAACTTTATTTTAATTTATGCATCTATGAGGGCCGAAAGAGGCTAAAAACAGACATACCAGTGAGATTT
GGAGAGTAAGGGGGTGTCAAGTGACCTTCTATCCCTGCCACAGGCACCTTGCTTGTTGTCAACCGCCATT
GTTACTATTTATCTAGTCTTTAACAGATTGGTACTTATTCTTTAAGGGGTGGATCATTTTCATGGCAGAG
TGCTTGCCCCCTTGATTTCAGATACGGTTTAATTACTGGGAGGGATATTTTTGTCTGTTCGGCCTGCACA
AGAACTTTGGGAAACAGCCCTGGGGGAGATTGAACTTCAGGTAAACAAGCCCAATTTCCGCACCTGGTTT
GCCAAAACTGTCGGACTTAAGTACGACGGCAGTGAGTTTATTATAGGTGTTCCCAATACTTTCGTAGCCG
AATATCTGGAGGTCAATCAGCGTTCGCTGATTGAAAAAACCCTGATAAATATTACCCACAGCCCGGTTGA
GCTGGGTTTCCAGCTTGTCCAGTCCGCTCAGGTACAGGCTGCCGCTCCCCAAACAGCCAGAGAAAAAACC
GTTTCACCCTTTAACCCCCGTTACACCTTTGAATCCTTTATAGTGGGTTCCTGCAACCGCCTGGCTCATG
CCGCTTCGCTGGCCGCCACCCAGAATCCCGGCAAGAGCTACAACCCGCTTTATATCTATGCGGCAGCCGG
TTTAGGCAAGACCCATCTTTTACAGGCTATCGGCCATCTAGCAAACTTAAACCGCCGCAAGGCCCTGTAT
GTCAGCGGGGAACAGTTTACCACTGACTTTATATCATCTATCCGGAACGGCCAAACCGAAGAGTTCCGTG
CCCGTTACCGGGATGTAGATTTATTGCTGCTGGATGATGTCCAGTTTATCGGCGGCAAGGAGCAGACCGA
AGAATGCCTGTTCCATACCTTTAATGACCTGCATAACTCCAACCGCCAGATAGTCATTTCAGCAGATTCA
CCCCCCAAGTCACTGCCCCAGCTGGCCGAAAGACTGCGTTCCCGTTTTGAGTGGGGGCTGACGATTGAGA
TTGAACCGCCGGATGAAAAAACCCGCTTGGAGCTTTTGCAGCTTAAAGCTGAGCAGTCCGGCACCGAACT
TAATATGGACACCCTGGAGTACCTGGCTCAGGAAGTAAAGCATAATATCCGCGAACTGGAAGGCAGCCTT
AACCGGGTGCTGGCCTATGCCCGCCTGCTAAGGGCTACCATTACCCCGGACCTGGCCGCCAGAGCCCTGT
CGGATATCGGCTCACGCCCGGTCAGGGAAAACAGCCCTCTCCGCCCCGGTAATATAATTTCAGCGGTATC
CCAGGTATTTCAAATACCCGCAACCGAACTTTTGGGTGCCGCCCGTGACAAAGATACCGCTCTGGCCCGT
CAGTTTGCCATGTTTATGCTAAAGCAGCAAAACTCCGCCTCACTGGTAGAAATAGGCCAGTCCCTGGGGG
GCAGAAGCGCTTCCACCGTCAGCCACGCCTGCGATAAAATCCAGCTGGAGTTGGAAAACAGCGCCTTTCT
GCGCCTGAAAATGTCCGAGGTTCAAAACCAGCTTTCCCAGCAGCGCCTTTCCCGCTGATATTAGCCCTTT
TCGCCGCACCGCTTTTCCTTATCCTTATATTTTTCTTTATTTTCATTCTGCCAGCAGGGTGCTTTTGCCG
GTTTTTCTATTCTTTTTAGACAGTCTTTCTATAACTTTATTATATTTTTCGATAACCGGGCTGAATTTTC
GATAACTTTGCAGATACTTTGCTTTAAAAATAAGACCGGAGGACAGGAATAGAGTTTTTACTCGTAAAGC
CTTATTATTAGTATTTCTGATATACTTAAAAATAAACCAGTTAAAGTTAATGGGATTTCGACAACTTAAG
AATTAGATAACTTTTTAGATAAGGTGTTTTTATATGTTTGACAGAGTGGAAATACGGATTAAGTCCGGAG
ACGGCGGCAGCGGCAAGGTTAGTTTCCGCCGCGAAAAATTTGTGCCTTACGGCGGGCCGGACGGGGGTGA
CGGCGGGGACGGGGGCAATGTATATCTGGAAGCTGATTCCGGGCTTTACAGCCTTTTAAATTTTAAACAT
AAACGGGTGCATAAGGCGGCCAACGGCGAGAACGGTATGGGCAGCCGCTGTACCGGCCACAACGGGGCTG
ACCTGGTGATAAAAGTGCCGGTGGGTACGGTTGCTACTATTGTGGAAGAAAACGGCCAGAAACGGGTTCT
GGCTGATTTGGCCGCTGACGGAGACCGTACCCTGGTAGCCCGCGGCGGGCAGGGCGGACTGGGCAATACC
CACTTTGTTTCGTCCACCAACCAGGCCCCCATGCTGGCTCAGAAAGGCCAGCCGGGCGGCGAATATGAGC
TGATACTGGAACTGAAACTGATTGCCGATGTGGCTATTATCGGCTATCCGAATGTGGGCAAATCTTCGCT
```

1,4 miljoen baseparen

bestaande uit A, T, G en C

Drie letters coderen voor aminozuren

20 aminozuren vormen de eiwitten

1580 eiwitten gevonden

Alle 20 aminozuren worden gemaakt

Dehalococcoides ethenogenes 195, complete genome. - 0..1469720
51 RNAs

Location	Strand	Length	PID	Gene	Synonym	Code	COG	Product
47719..50667	+	2949	57223978		-	DET_De23S	-	-	23S ribosomal RNA
50767..50889	+	123	57223978		-	DET_De5S	-	-	5S ribosomal RNA
57782..57857	+	76	57223978		-	DET_tRNA-Ala-1	-	-	Ala tRNA
149037..149112	+	76	57223978		-	DET_tRNA-Val-1	-	-	Val tRNA
308964..309039	-	76	57223978		-	DET_tRNA-Ala-2	-	-	Ala tRNA
342947..343207	+	261	57223978		-	DET_DernpB1	-	-	sRNA
364688..364762	+	75	57223978		-	DET_tRNA-Thr-1	-	-	Thr tRNA
396447..396522	-	76	57223978		-	DET_tRNA-Met-1	-	-	Met tRNA
527290..527379	-	90	57223978		-	DET_tRNA-Ser-1	-	-	Ser tRNA
666312..666401	-	90	57223978		-	DET_tRNA-Ser-2	-	-	Ser tRNA
666436..666525	-	90	57223978		-	DET_tRNA-Ser-3	-	-	Ser tRNA
668207..668278	+	72	57223978		-	DET_tRNA-Arg-1	-	-	Arg tRNA
674395..674472	+	78	57223978		-	DET_tRNA-Pro-1	-	-	Pro tRNA
676389..676463	-	75	57223978		-	DET_tRNA-Gly-1	-	-	Gly tRNA
677016..677090	+	75	57223978		-	DET_tRNA-Met-2	-	-	Met tRNA
689105..689181	+	77	57223978		-	DET_tRNA-Arg-2	-	-	Arg tRNA
698661..698745	-	85	57223978		-	DET_tRNA-Leu-1	-	-	Leu tRNA
701192..701268	+	77	57223978		-	DET_tRNA-Pro-2	-	-	Pro tRNA
740686..740761	+	76	57223978		-	DET_tRNA-Phe-1	-	-	Phe tRNA
740836..740922	+	87	57223978		-	DET_tRNA-Leu-2	-	-	Leu tRNA
740952..741025	+	74	57223978		-	DET_tRNA-Gln-1	-	-	Gln tRNA
741036..741110	+	75	57223978		-	DET_tRNA-Asn-1	-	-	Asn tRNA
748011..748083	-	73	57223978		-	DET_tRNA-Lys-1	-	-	Lys tRNA
781966..782040	+	75	57223978		-	DET_tRNA-Gly-2	-	-	Gly tRNA
832857..832929	-	73	57223978		-	DET_tRNA-Lys-2	-	-	Lys tRNA
877642..877717	-	76	57223978		-	DET_tRNA-Arg-3	-	-	Arg tRNA
877734..877809	-	76	57223978		-	DET_tRNA-His-1	-	-	His tRNA
913341..913416	-	76	57223978		-	DET_tRNA-Thr-2	-	-	Thr tRNA
913479..913562	-	84	57223978		-	DET_tRNA-Tyr-1	-	-	Tyr tRNA
913603..913675	-	73	57223978		-	DET_tRNA-Thr-3	-	-	Thr tRNA
928040..928116	-	77	57223978		-	DET_tRNA-Ile-1	-	-	Ile tRNA
928439..929873	-	1435	57223978		-	DET_De16S	-	-	16S ribosomal RNA
930500..930576	-	77	57223978		-	DET_tRNA-Glu-1	-	-	Glu tRNA

Ademhaling Dehalococcoides

Synthese van ATP

F-type ATPase (Bacteria)

beta	alpha	gamma	delta	epsilon	c	a	b

F-type ATPase (Eukaryotes)

beta	alpha	gamma	OSCP	delta	epsilon	c	a
b	e	f6	f	8			
d	f	h	j	k	g		

V-type ATPase (Prokaryotes)

A	B	C	D	E	F	I	K

V-type ATPase (Eukaryotes)

A	B	C	D	E	F	G	H
I	AC39	54kD	S1	lipid			

Maakt DNA zelf

Maakt vitamine B12

Gebruikt geen methanol

Geen lactaat wel acetaat

00620 3/23/06

Twee belangrijke koolstofbronnen

Figure S6. Central carbon metabolism pathways in *D. ethenogenes* predicted from the genome

Uit de metabole pathways is op te maken dat Dehalococcoides geen acetaat kan maken en CO2 gebruikt.

Deze twee stoffen moet de bacterie voor groei vanuit zijn omgeving zien te krijgen.

De centrale rol van waterstof

Affinity for H_2 determines predominant electron accepting processes

Electron Acceptor Process	Hydrogen Concentration (nM)
Aerobic (O_2) respiration	<0.1
Denitrification	<0.1
Iron(III) reduction	0.2 - 0.6
Dehalorespiration	< 0.31
Sulfate reduction	1 - 4
Methanogenesis	>5
Acetogenesis	>336

concurenten

Bottom Line: Dehalorespiring bacteria can out-compete methanogens for hydrogen

The Ubiquity of Hydrogenase

H_2 →

CO_2 —Methanogens→ CH_4

CO_2 —Acetogens→ Acetate

SO_4^{-2} —Sulfur Reducers→ H_2S

Fe^{3+} —Iron Reducers→ Fe^{2+}

NO^{3-} —Denitrification→ N_2

N_2 —Nitrogen fixation→ NH_2^-

CO_2 —Photosynthesis→ Sugars

Chemautotrophy

Anaërobe Biostimulatie

Dechlorination in anaerobic food-webs

Competing electron flow pathways in anaerobic sediments

Patent pending: PCT/NL2006/000124 - NL 1028531 (13-03-2005)

Methanol geen goed substraat

Figure 2.1 Interaction between Microbial Agents in Reductive Dechlorination using Methanol as Electron Donor (Non-Inhibitory PCE concentrations)

Elk substraat is indirect en niet trefzeker

De concurentie naar methaan bestaat ook bij ons systeem

Figure 2.2 Interaction between Microbial Agents in Reductive Dechlorination under Non-Inhibitory PCE concentrations

Wat is voor een snelle dechlorering nodig?

What is Needed for Effective Anaerobic Bioremediation?

- ~~Organic substrates that ferment to:~~
  - Acetate
  - Hydrogen (H_2)
  - Hydrogen concentrations > 1 nM
- ~~Strongly reducing conditions (Sulfate Reducing or Methanogenic)~~
- ~~Nutrients~~
  - ~~Vitamins and trace minerals to stimulate~~ *Dehalococcoides* growth
- Halorespiring bacteria (e.g., *Dehalococcoides ethenogenes* for DCE/VC)

Acetaat, waterstof, koolzuur, chloorethenen én de bacterie Dehalococcoides

Geen vitamine B12, of reducerende omstandigheden en spoorelementen

De bacterie is overal waar geen zuurstof is.

Voorbeelden van beperkt succes

- Soluble – lactate, molasses, ethanol
- Viscous Fluids – HRC®, HRC-X, neat vegetable oil
- Low Viscosity Fluids – vegetable oil microemulsions, cheese whey
- Solids Substrates – mulch, compost, chitin
- Experimental – hydrogen gas, humic acids

- Soluble, mobile
  - alcohols, sugars, lactate, acetate, citrate
- Semi-soluble or emulsions, less mobile
  - oleate, sterate, emulsified vegetable oil
- Solid, slow release compounds
  - Chitin, HRC
- Microorganisms (bioaugmentation)
  - Dehalococcoides (DHE)
- Nano-scale particles

Voorbeelden gebruikte substraten

Substrate	Injected Form and Concentration	Target Concentration in the Formation
Sodium Lactate, Lactic Acid	Diluted 3 to 30 percent by weight	50 to 300 mg/L
Ethanol, Methanol	Diluted 3 to 30 percent by weight	50 to 300 mg/L
Molasses, Fructose Corn Syrup	Diluted 1 to 10 percent by weight	50 to 500 mg/L
Hydrogen Release Compound (HRC®)	Pure product injected at 4 to 12 pounds per foot	100 to 500 mg/L (lactic acid)
Vegetable Oil	Oil-in-water emulsion	100 to 500 mg/L (TOC)

Zuurstof is dodelijk

Verband tussen groeisnelheid en zuurstofspanning bij verschillende microben

Curve a: obligaat aerobe microben (verzadigingscurve)
Curve b: facultatief anaerobe microben
Curve c: microaerofiele microben (optimumcurve)
Curve d: obligaat anerobe microben

Voorbeeld waarbij Dehalococcoides dood werd gemaakt

Het diffusieprobleem

Schadstofftransport gesteuert durch:

Advektion

Advektion + Dispersion/Diffusion

Advektion + Dispersion/Diffusion
+ Sorption/Retardation

Advektion + Dispersion/Diffusion
+ Sorption/Retardation
+ **Abbau**

Diffusie van boven bekeken

Doorlaadbaarheid per grondsoort

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
$<1E^{-9}$	$1E^{-9}$	$1E^{-8}$	$1E^{-7}$	$1E^{-6}$	$1E^{-5}$	$5E^{-4}$	$1E^{-4}$	$5E^{-4}$	$1E^{-3}$	$7E^{-3}$	$3E^{-2}$

Substratklassen in Abhängigkeit der Korngröße
Größenordnung des Durchlässigkeits-Koeffizienten (k_f) im m/s

injectievoorbeelden

Passieve en actieve injecties

Diffusie en afbraak meten

Theorie

Praktijk

gassen

meetpunt is ertussen gekomen

acetaat

a t/m e acetaatinjecties

1 t/m 6 waterstof/CO2/N2

Recirculatie vanuit 10 naar elk acetaatpunt een paar uur per dag

Alle 13 punten zouden meetpunten zijn

Resultaten Berk

Voor: **(eenheden ug/l)**

	VC	DCE	TRI	PER
M14		1944	139	7689
M17		23	9	46

Na twee maanden:

M14	131	1194	23	755
M17	95	1030	85	6

In M14 is 90% reductie van PER en 82% van alle DCE opgetreden, naast een toename van VC

In M17 nemen PER en TRI niet af en is door substraattekort een toename van DCE en VC.

De diffusie van 3 meter in deze bodem is voor acetaat te ver.

Snelle en langzame omzetting

Snelle omzetting in lab

Figur 6. Nedbrydning af 10 mg/l PCE svarende til ca. 60 μM.

Figur 7. Nedbrydning af 100 mg/l PCE svarende til ca. 600 μM.

De snelste ontchloring

FIG. 2. (a) Product formation by PCE-grown strain 195 inoculated into medium to which one dose of PCE (0.7 mmol/liter) was added. (b) Plot with an expanded scale, showing intermediates in PCE metabolism, including individual DCE isomers.

FIG. 3. Intermediate formation by TCE-grown strain 195 inoculated into medium to which a single dose consisting of 0.35 mmol of TCE per liter was added.

0,7 mmol/l PCE = 110.000 ug/l

Afgraven en alleen in de pluim

Schematic showing staged plume remediation using Waterloo Emitters, monitored by a transect of CMT or Waterloo Multilevel Systems

Geen opties

Bioscherm in de pluim

Alleen behandeling van de pluim

Weer niet de bron maar de pluim

CMT Transects for Mass Flux Assessment

Voorstel tot saneren

Fig. 1. Verspreiding verontreinigd grondwater.

Geen duur scherm die de situatie jarenlang in standhoud omdat de bron weg is

Geen lactaat maar acetaat en het gaat nog sneller

Dehalococcoides culture

- *Dehalococcoides* breathes TCE under strictly anaerobic conditions, using hydrogen for food.
- Microbial consortia ferment lactate to hydrogen, providing *Dehalococcoides* food to degrade TCE to ethene.
- When *Dehalococcoides* is absent, degradation stalls at DCE or VC

Roltoewijzing aan partijen

EuroStaete

EuroStaete

Het land met onbegrensde mogelijkheden