



Moleculair biologisch onderzoek naar de biologische afbraak van 1,4-Dioxaan

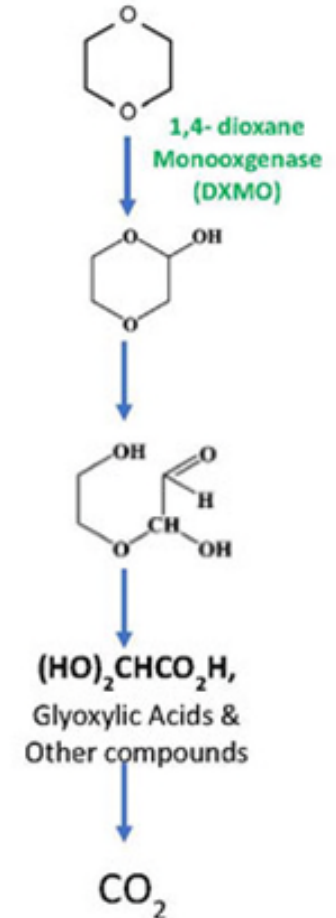
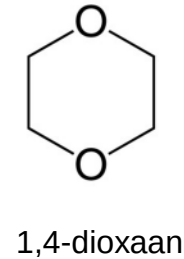
31 maart 2022

Charles Pijls



1,4-dioxaan

- 1,4-dioxaan (1,4 DX)
 - Additief voor gechloreerde oplosmiddelen (TCA)
 - Oplosmiddel (vervanging voor THF)
 - Pharmacie, cosmetica, verzorgingsmiddelen
- Eigenschappen :
 - Volledig oplosbaar in water
 - Lage Henry coefficient
 - Biologische afbraak niet goed bekend
 - Aeroob Cometabool (ENV425, propaan) ($< 10 \text{ mg/l}$)¹
 - Aeroob Metabool (o.a. *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190 met DXMO/ALDH²) ($> 10 \text{ mg/l}$)
 - Geen aanwijzingen voor anaerobe afbraak
- ZZS sinds juli 2021

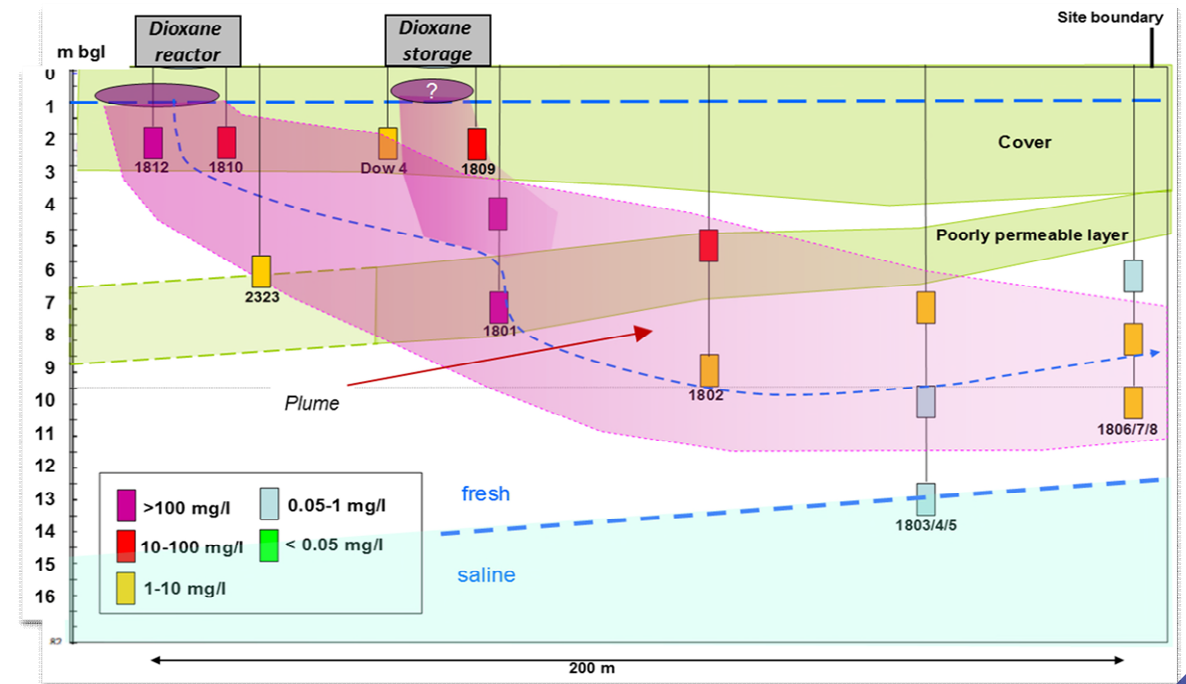


1. 2019 - Barajas-Rodriguez, Simulation of in situ biodegradation of 1,4-dioxane under metabolic and cometabolic conditions
2. 2014 - Gedalanga et al. Identification of Biomarker Genes to Predict Biodegradation of 1,4-Dioxane

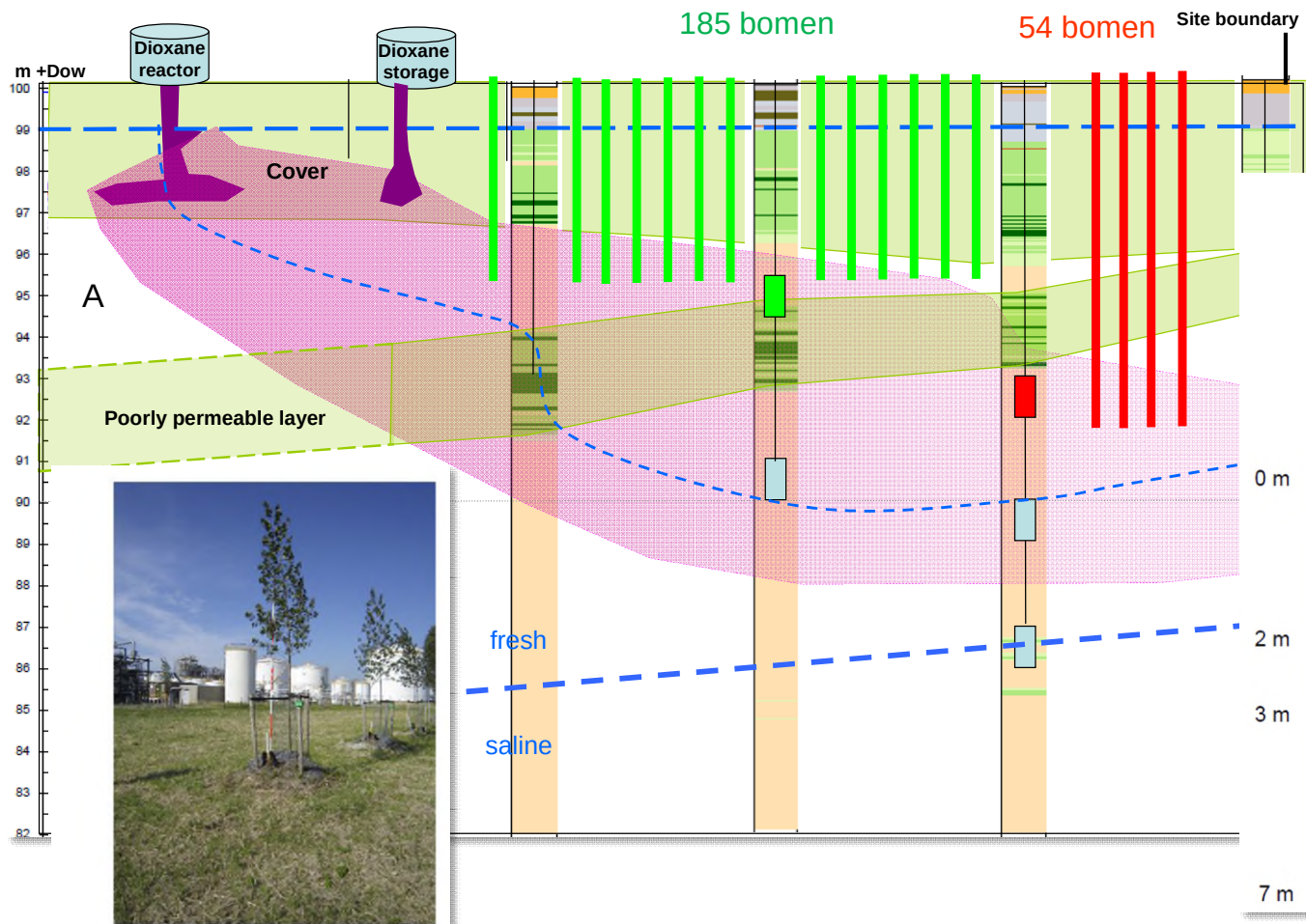


Locatie

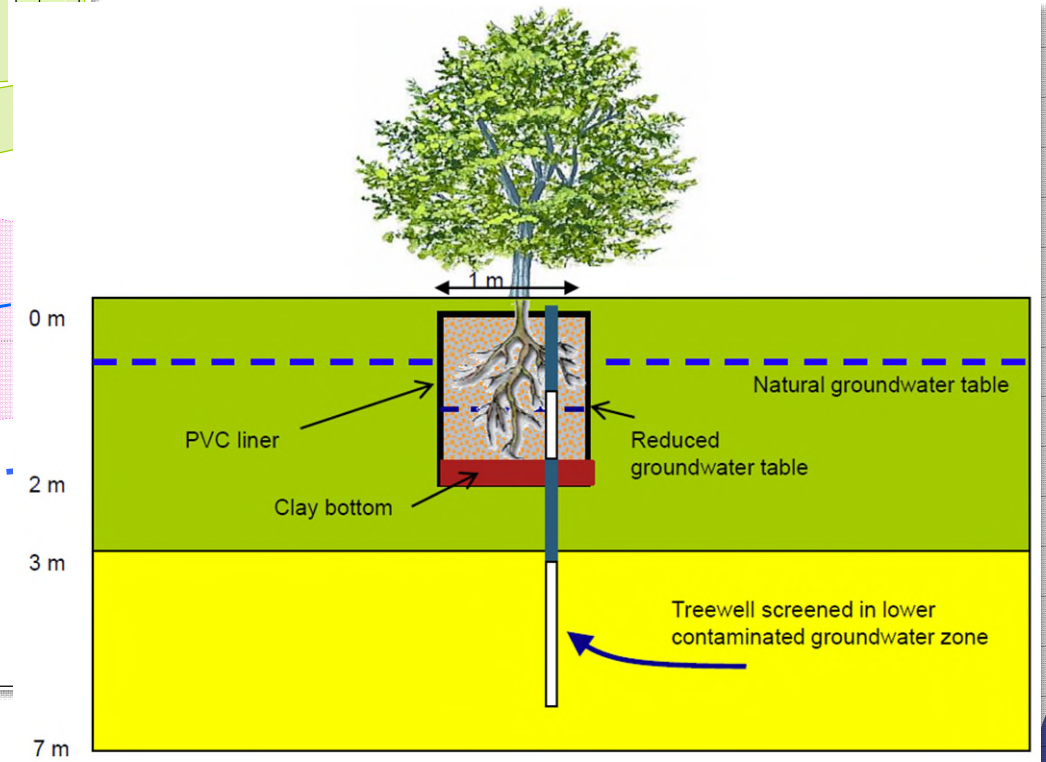
- Voormalige 14-dioxaan productie locatie
- Bodem en grondwater verontreiniging
- Aanpak pluim
 - Beheersing met phytoremediatie
- Aanpak bron
 - Biologische sanering (in situ/on site)
 - Biopiling
 - In situ
 - Bioreactor



Saneringssysteem pluim (2014) – Phytoremediatie met TreeWells®



TreeWell® system designed and installed by Applied Natural Sciences



Biologisch onderzoek

Onderzoek	Doel	Methode	Uitvoerende
1. Afbraak in grond bronzone	Vaststellen mogelijkheden aerobe metabole afbraak	Lab onderzoek qPCR (Microbial Insights)	Bioclear Earth/- Greensoil
2. Afbraak in wortelzone phytoremediatie	Vaststellen mogelijkheden stimuleren rhizodegradatie met CB1190	Lab onderzoek qPCR (UCLA)	AECOM (US)
3. Isolatie 14-dioxaan afbrekende bacterien	Identificeren bacterien afbraak	NGS (Bioclear Earth)	Bioclear Earth
4. Afbraak in grondwater op pilot schaal	Vaststellen mogelijkheden opschaling naar bioreactor	Pilot test Mobiele qPCR Udetect	Greensoil



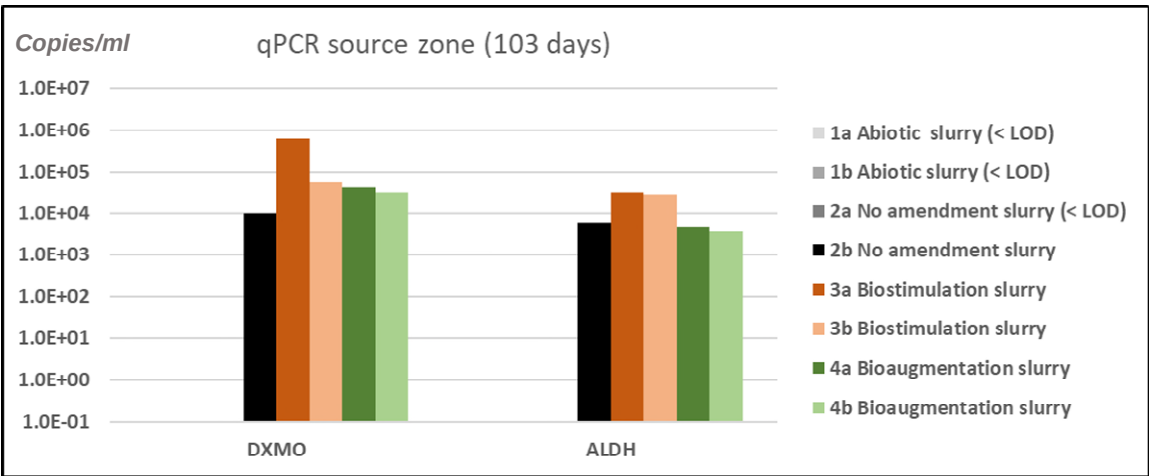
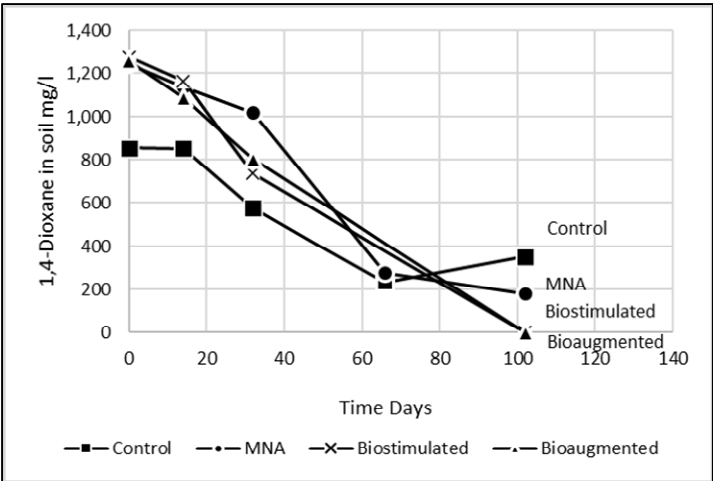
1. Afbraak 1,4-dioxaan in grond bronzone

- Vaststellen mogelijkheden aerobe metabole afbraak in grond
- 2 testen uitgevoerd (Bioclear/Deltares en Greensoil)
- Slurry monsters grond en grondwater uit bronzone
- Opzet:
 - Abiotisch
 - Natuurlijke afbraak
 - Gestimuleerde afbraak met nutriënten (biostimulated)
 - Gestimuleerde afbraak met ent (grond uit wortelzone) en nutriënten (bioaugmented)
- qPCR monsters genomen op einde van de test Greensoil/Deltares

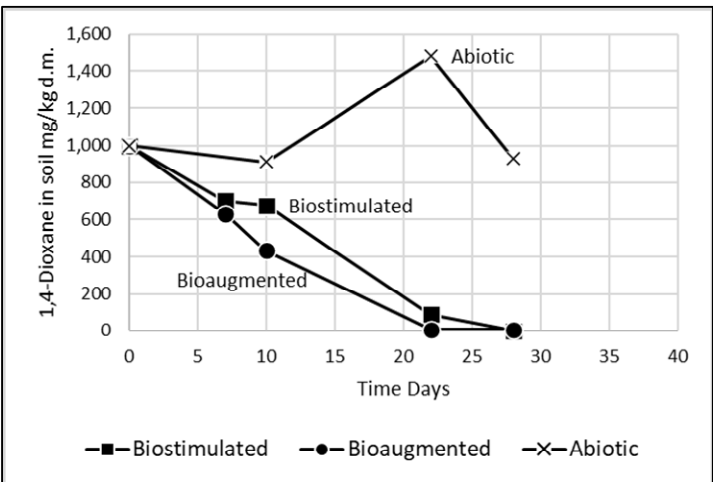


1. Afbraak 1,4-dioxaan in grond bronzone - qPCR

Greensoil/-
Deltares



Bioclear



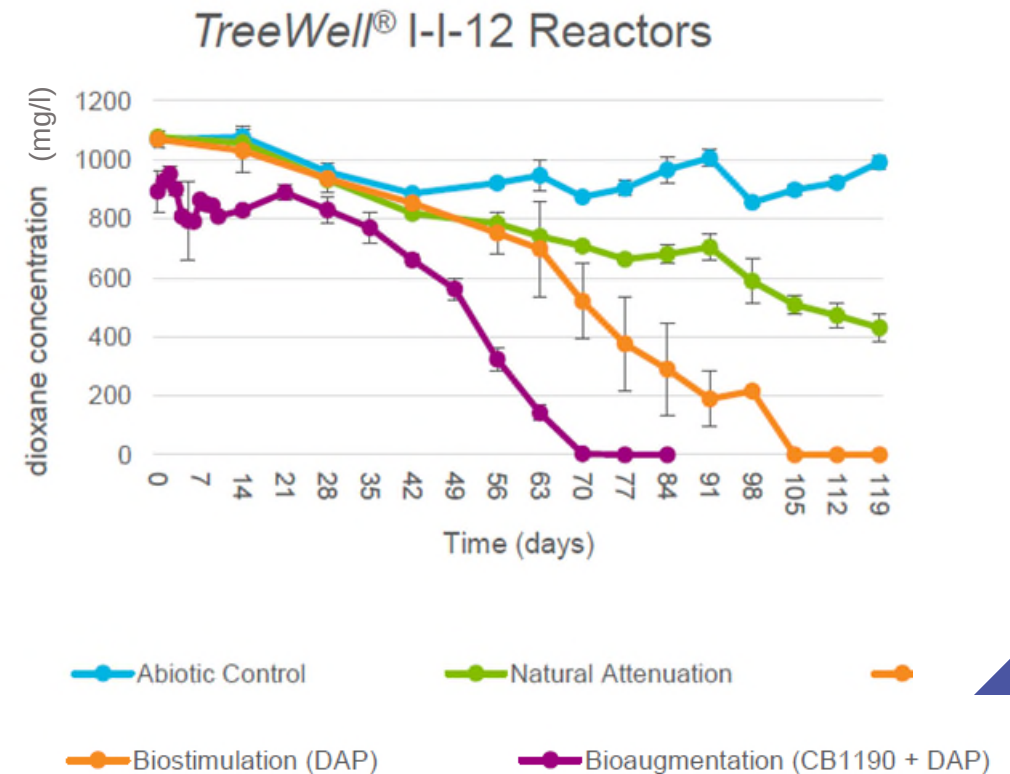
1. Afbraak 1,4-dioxaan in grond bronzone - conclusies

- Metabole afbraak van 1,4-DX is mogelijk
- qPCR op DMXO/ALDH bevestigt toename afbraak capaciteit 14 DX
- Lagere DMXO en ALDH gehalten (4×10^3 tot 4×10^5 kopien/ml) ten opzichte van literatuur waarden ($10^7 - 10^9$ kopien/ml)

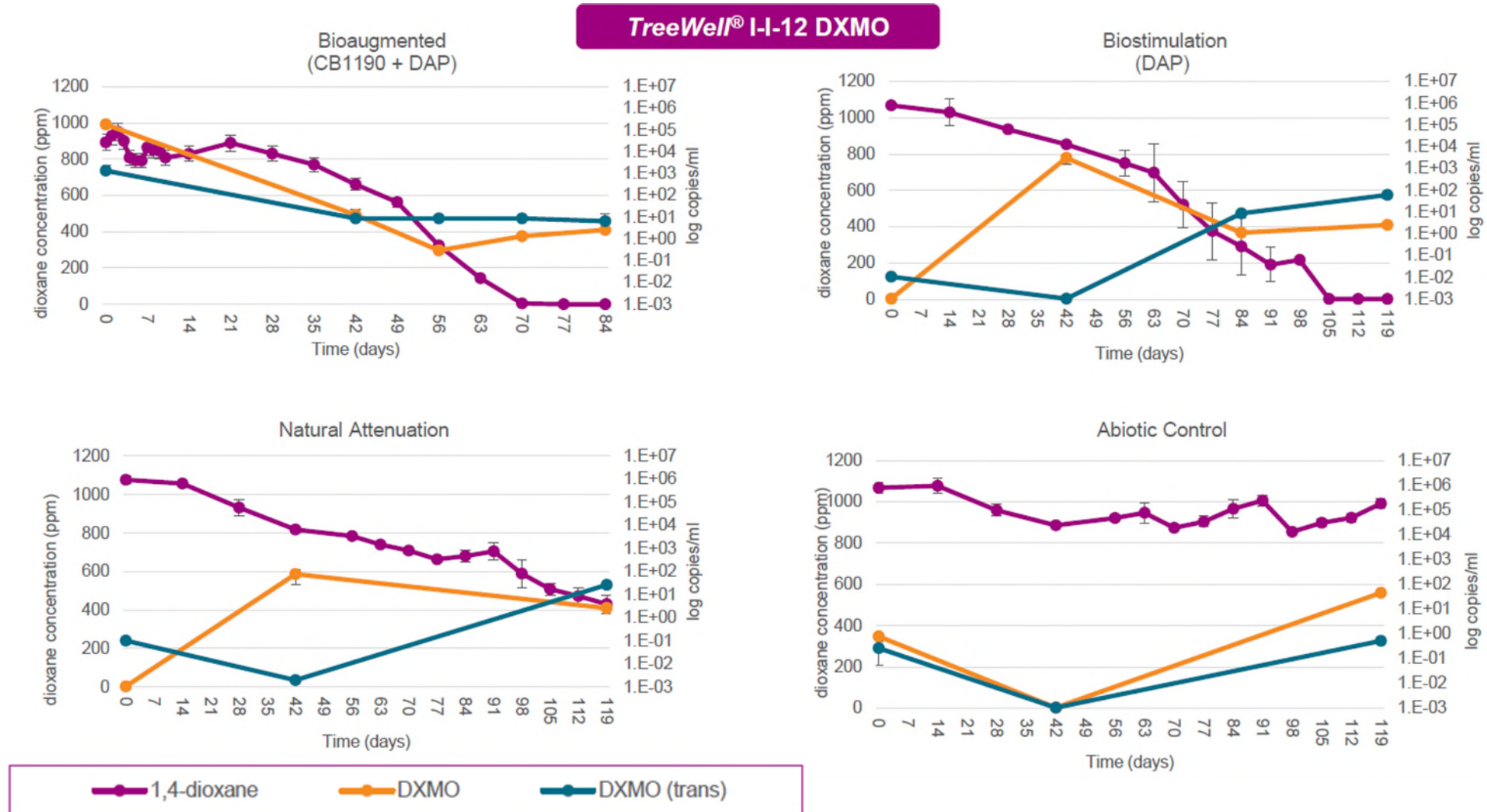


2. Afbraak in wortelzone phytoremediatie

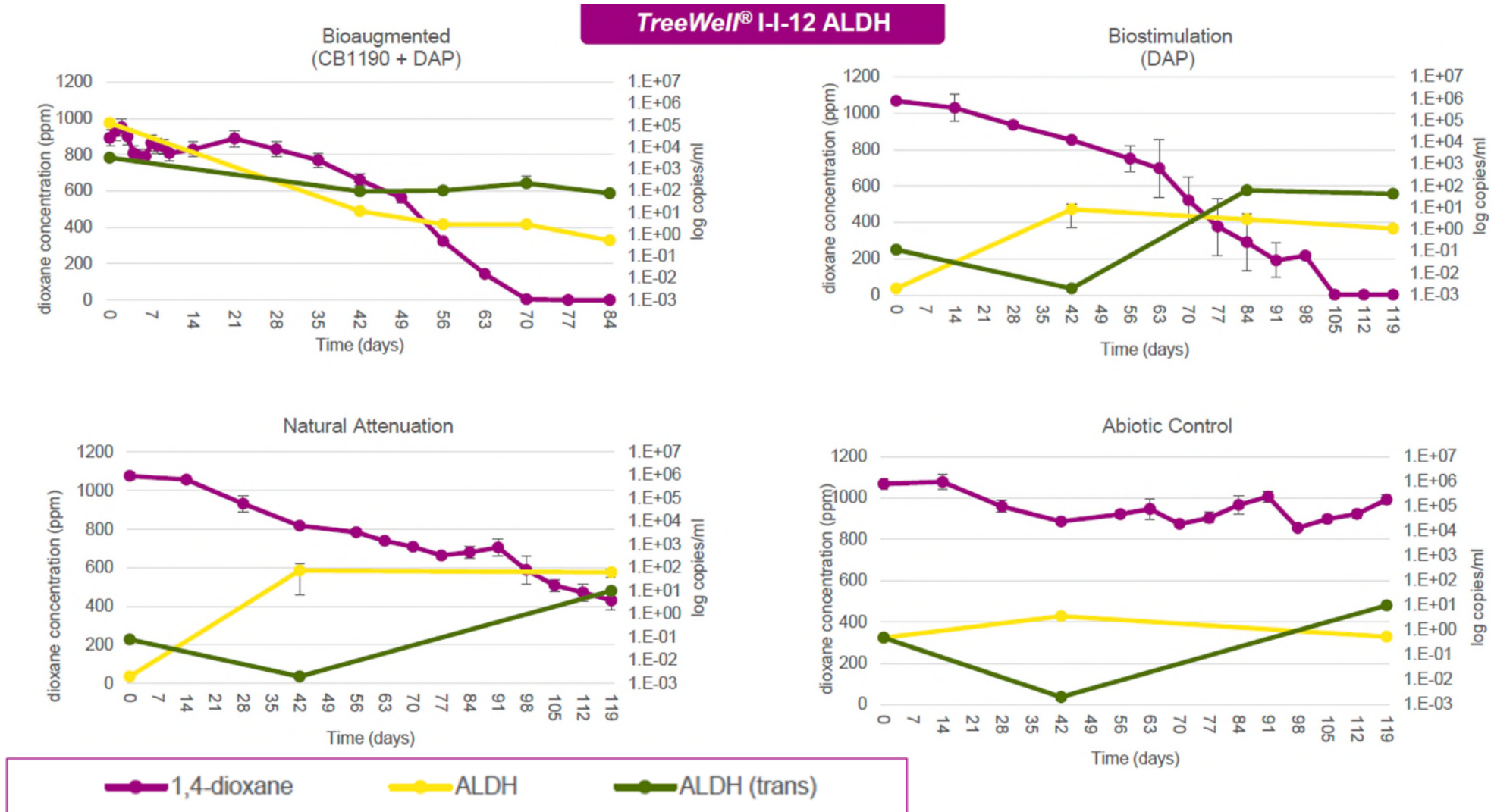
- Labexperimenten grond uit wortelzone
- Doel: Stimuleren rhizodegradatie CB1190
- Slurry monsters grond en grondwater uit pluim
 - Gestimuleerde afbraak met ent en nutriënten
Bioaugmentation CB1190 + DAP
 - Gestimuleerd afbraak met nutriënten
Biostimulated DAP
 - Natuurlijke afbraak
 - Abiotisch
- qPCR monsters op verschillende tijdstippen



2. Afbraak in wortelzone phytoremediatie - DXMO



2. Afbraak in wortelzone phytoremediatie - ALDH



2. Afbraak in wortelzone phytoremediatie - Conclusies

- Phytostimulatie niet nodig omdat afbraak met van nature aanwezige bacterien kan worden gestimuleerd
- Fytovolatilisatie laag door natuurlijke afbraak dioxaan in wortelzone
- qPCR op DXMO/ALDH wijst op toename capaciteit, maar is niet eenduidig (ook toename bij abiotische controle)
- Lagere DMXO en ALDH gehalten (10^2 kopien/ml) ten opzichte van literatuur waarden ($10^7 - 10^9$ kopien/ml)



3. Isolatie 1,4-dioxaan afbrekende micro-organismen

- Grond monsters :
 - Wortel zone phytoremediatie
 - Brongebied (conc 500-1.000 mg/kg)
- Groeiexperimenten op :
 - Aeroob: Initieel (1,4-dioxaan, THF, Gist)
 - Later groei op 1,4-dioxaan als enige koolstofbron
 - Anoxisch :
 - 1,4-dioxaan



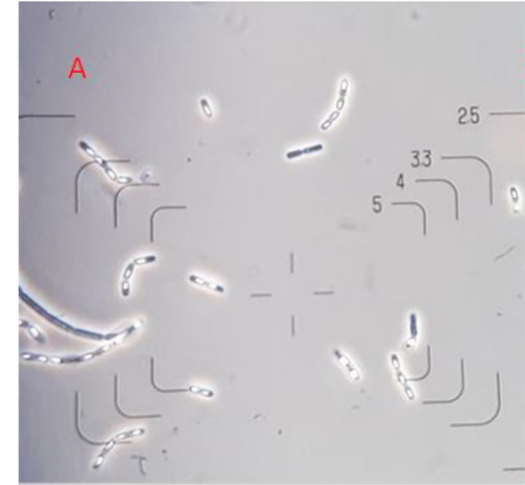
3. Isolatie 1,4-dioxaan afbrekende micro-organismen

- Resultaten :

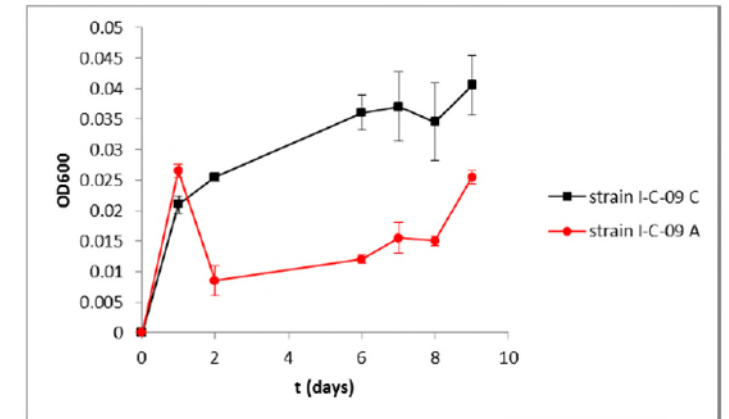
- Anoxisch:
 - Geen 1,4-Dioxaan afbrekende micro-organismen aangetroffen
- Aeroob:
 - 16 individuele type bacterien geïsoleerd die 1,4-Dioxaan metabool afbreken
 - Snelst groeiende cultuur in wortelzone
 - RNA NGS analyse

Table 1. Characteristics of fastest growing strains I-C-09 A, B, and C

Strain	Morphology	Gram	Endospore	Capsule	Flagella	Motility	Catalase		Oxygen tolerance
							3 %	15 %	
I-C-09 A	rod	—	—	—	—	—	+	+	Aerobic
I-C-09 B	rod	—	+	—	—	—	+	+	Aerobic
I-C-09 C	rod	—	—	—	—	—	+	+	Aerobic



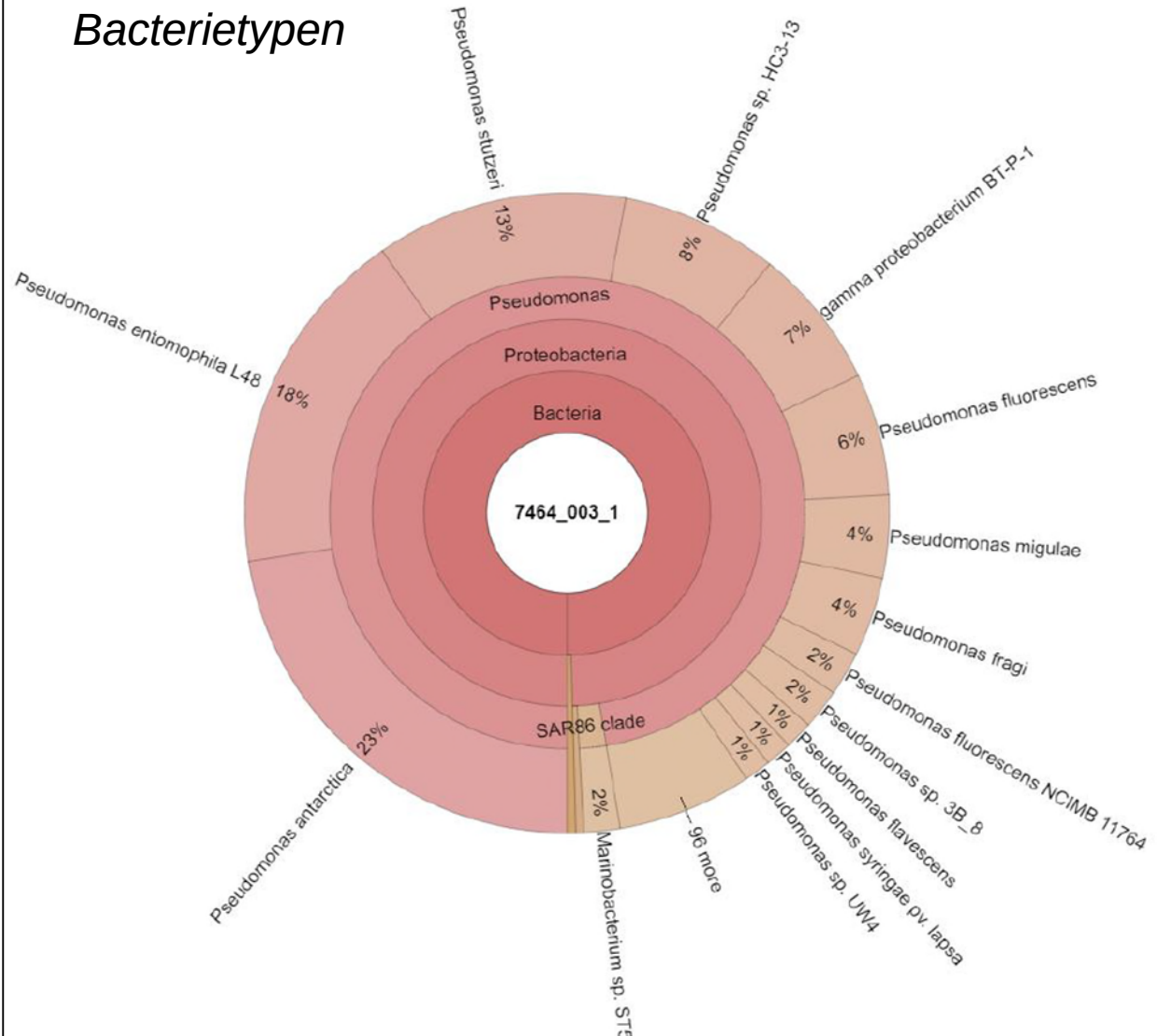
Isolated strain capable of degrading 1,4-Dioxane



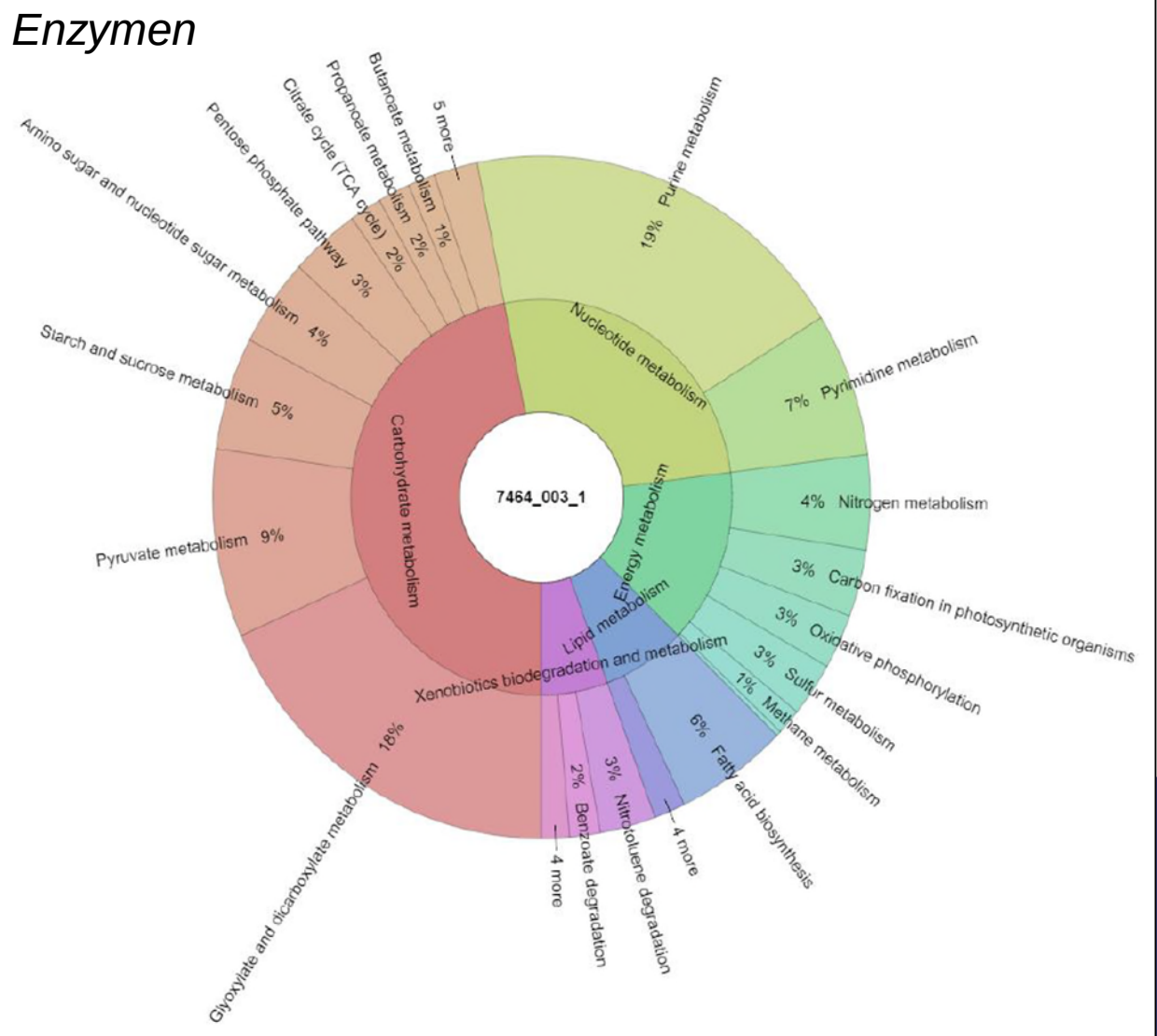
Growth curve of I-C-09 A and C on 1,4-dioxane

RNA NGS Metapathviewer®

Bacterietypen



Enzymen



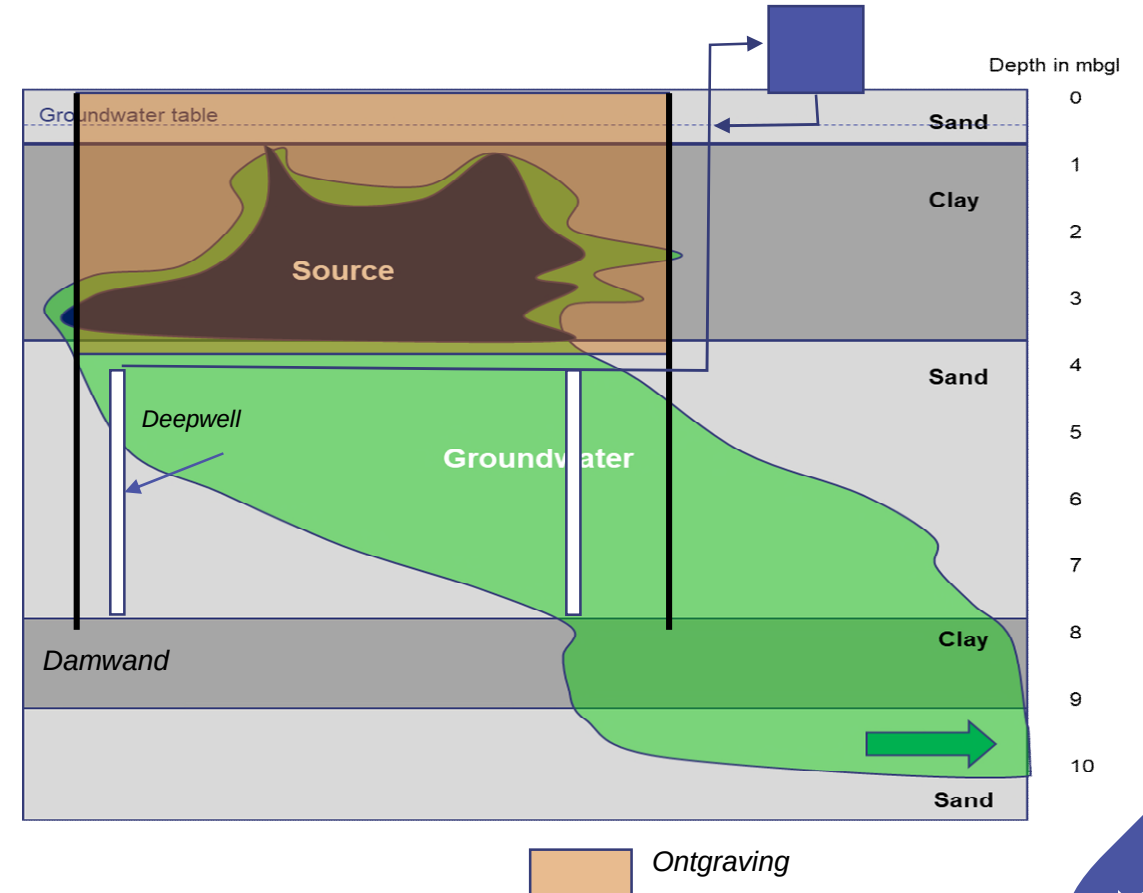
3. Isolatie 1,4-dioxaan afbrekende micro-organismen

- Resultaten NGS analyse:
 - *Pseudomonas spp* als actieve cultuur (geen *Pseudonocardia*)
 - Geen DXMO aangetroffen, ook geen homologen
 - ALDH wel aangetroffen
- Mogelijke oorzaken
 - monster laat genomen in afbraakproces
 - dioxaanafbraak door ander type bacterie



4. Bronaanpak Full scale

- Biologische sanering
- Ontgraving brongebied
 - Grond : biopiling
- Grondwaterrecirculatie over bioreactor
- Pilot test met bovengrondse bioreactor
- Pilot test opgestart juli 2021
 - Aantonen afbraak dioxaan op praktijkschaal in waterzuivering
 - In situ afbraak test



4. Afbraak in grondwater op pilot schaal

- Afbraak komt niet op gang na 6 maanden, oorzaak onbekend:
 - pH stijging door strippen CO₂ naar pH 8,5-9,0
 - Anders ?
- In parallel opgestarte labexperimenten
 - Alleen afbraak onder gestimuleerde omstandigheden (nutrienten)
 - Geen afbraak in pH gebufferde proeven
 - Geen DXMO/ALDH aangetroffen met Udetect in actieve omstandigheden
- Monsters van lab- en veldexperimenten naar Bioclear Earth voor NGS



Afbraak van 1,4-Dioxaan - conclusies

- Dioxaan kan aeroob metabool afgebroken worden
- qPCR lijkt nuttige tool om afbraak aan te tonen
- DXMO/ALDH aangetoond in experimenten, maar niet onomstreden
- NGS resultaten wijzen op mogelijk ander geslacht dat 14DX kan afbreken
- Nog geen goed inzicht in optimale en beperkende omstandigheden voor afbraak

