

Fungi Farming®: gebruik van schimmels bij de afbraak van persistente verontreinigingen

Samenvatting en conclusies

Complexe verbindingen als polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK) kunnen met behulp van schimmels in een variant op landfarming in enkele maanden worden afgebroken (in 2-3 maanden een reductie van 65-95%). De techniek presteert goed onder diverse omstandigheden, zoals lage temperaturen en specie met een hoog kleigehalte. Naast PAK blijkt ook minerale olie in korte tijd met 90-95% afgebroken te worden.

In vergelijking met traditionele landfarming is deze ontwikkeling veelbelovend. Traditionele landfarming vergt doorgaans een veel langere behandelingstijd en is bovendien niet of nauwelijks in staat tot afbraak van hoog moleculaire verbindingen.

De techniek maakt het mogelijk om in korte tijd en on-site klasse 3 en 4 baggerspecie te reinigen tot klasse 2 specie. Hierdoor ontstaan geheel nieuwe mogelijkheden om met baggerspecie en grond, die met PAK en olie verontreinigd zijn, om te gaan.

Beperkingen landfarming

Tot nu toe heeft landfarming van met olie en PAK-verontreinigde baggerspecie niet tot de gewenste resultaten geleid (DHV/POSW, 1993 en 1995). Lichte componenten werden langzaam afgebroken, zware componenten vrijwel niet. Deze tegenvallende resultaten worden voornamelijk veroorzaakt doordat bacteriën te weinig toegang hebben tot de verontreinigingen, hetzij vanwege de molecuulgrootte, hetzij vanwege de sterke adsorptie aan bodemdeeltjes. Hierdoor is biologische reiniging van kleirijke grond en baggerspecie vrijwel uitgesloten.

Met behulp van specifieke schimmels in een variant op landfarming lijken deze bezwaren te zijn ondervangen. Deze techniek, *Fungi Farming®*, maakt gebruik van de extracellulaire enzymsystemen van basisdiomyceten, een groep van zwamvormende schimmels, waartoe ook de witrotschimmels behoren. Aangetoond is dat met behulp van deze schimmels de afbraak van complexe verbindingen als PAK aanzienlijk beter en sneller verloopt. Er zijn aanwijzingen (Morgan et al, 1991¹; Field et al, 1993¹¹) dat ook gechloroerde verbindingen als DDT, PCB's en dioxines met deze techniek aangepakt kunnen worden.

Gebruik van schimmels

Planten en bomen produceren lignine, dat onderdeel wordt van het houtskelet. Lignine is een

biopolymeer met een onregelmatige aromatische structuur (figuur 1). Een kleine groep organismen, de witrotschimmels, is in staat het lignine te mineraliseren. Deze mineralisatie berust op afscheiding van specifieke enzymen, zoals lignine-peroxidase en mangaan-peroxidase en enzymen die waterstofperoxyde produceren. Daarin onderscheiden schimmels zich van bacteriën, die niet in staat zijn lignine op deze manier af te breken.

Veel experimenten zijn uitgevoerd met witrotschimmels als *Trametes versicolor* (Field et al, 1992¹⁰), *Phanerochaete chrysosporium* (Field et al, 1993¹¹) en *Bjerkandera*-soorten (Kaal et al, 1993¹²) om lipofiele verontreinigingen zoals PAK af te breken, omdat deze een structuur hebben die lijkt op lignine (figuur 2). Bij deze experimenten (Field et al, 1993¹¹) is aangetoond dat witrotschimmels die peroxidases uitscheiden in staat zijn tot afbraak van PAK.

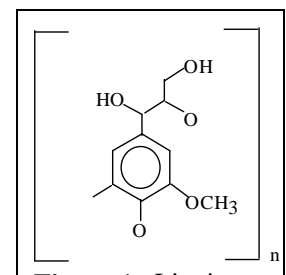


Figure 1 : Lignin

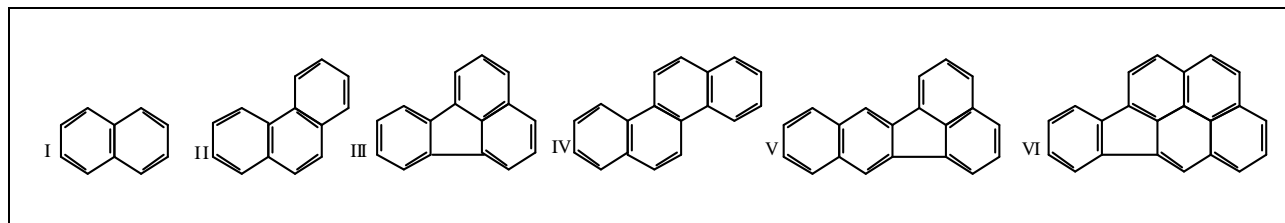


Figure 2: Structure of some PAH-components : naphthalene(I), phenanthrene(II), fluoranthene(III), chrysene(IV), benzo(k)fluoranthene(V) and indeno(1,2,3-cd)pyrene(IV).

Onderzoek van DHV heeft aangetoond dat ook andere dan de voornoemde schimmels in staat zijn tot afbraak van PAK-verbindingen. Hierdoor nemen de praktische toepassingsmogelijkheden van schimmels bij de afbraak van verontreinigingen in van grond en baggerspecie aanzienlijk toe.

Samen met enkele waterkwaliteitsbeheerders heeft DHV onderzoek uitgevoerd naar de toepassing van de op laboratoriumschaal ontwikkelde kennis (DHV/Hoogheemraadschap Amstel en Vecht, 1995⁸; DHV/Waterschap de Drie Ambachten, 1995⁹). Het doel hiervan was vast te stellen of met PAK verontreinigde baggerspecie op grotere schaal te reinigen is met behulp van schimmels, speciaal toepassingsmogelijkheden die aansluiten bij de dagelijkse praktijk van de waterbeheerders:

- toepassing in de open lucht, onder sterk wisselende weersomstandigheden
- toepassing in aansluiting op het onderhoudsbaggerwerk in het najaar
- toepassing op verschillende grond/baggersoorten met wisselende verontreinigingsgraad.

In eerste instantie was het DHV-onderzoek gericht op het vinden van de toepassingsmogelijkheden van de op laboratoriumschaal veel gebruikte schimmels *Phanerochaete chrysosporium* en *Trametes versicolor*. Om praktische redenen viel *Phanerochaete chrysosporium* al snel af:

- stikstof, veel aanwezig in baggerspecie, heeft groeieremming van de schimmel tot gevolg (Barclay et al, 1993³) en remt de productie van peroxidases (Field et al, 1992¹⁰)
- vanwege het thermotolerante karakter is eigenlijk alleen toepassing binnen mogelijk
- grote affiniteit voor hout, waardoor doorgroei in grond beperkt is.

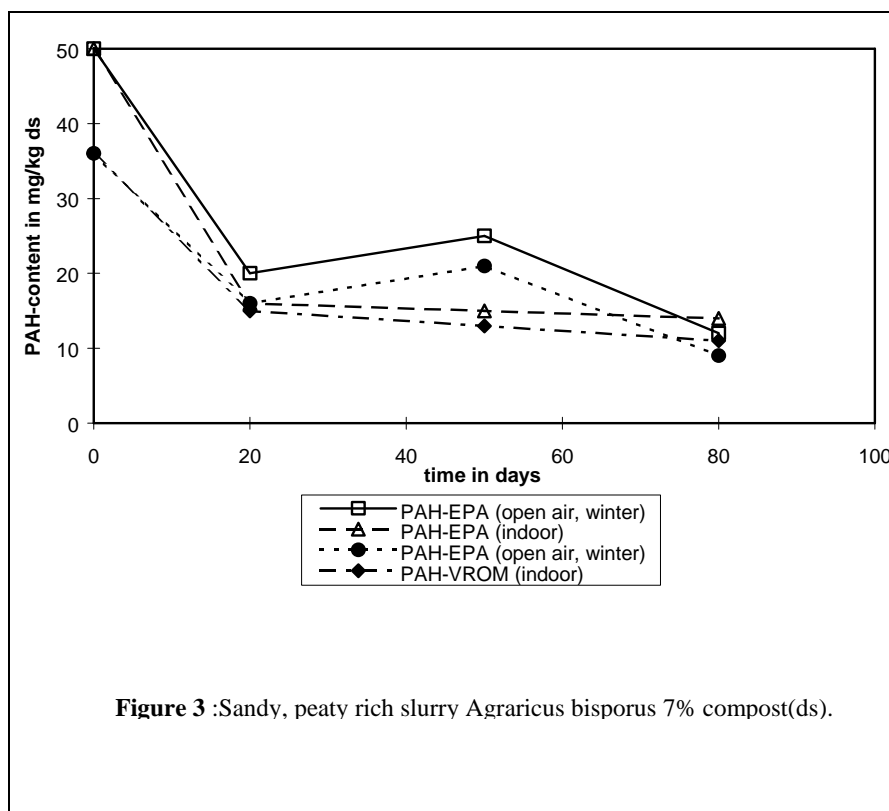


Figure 3: Sandy, peaty rich slurry *Agraricus bisporus* 7% compost(ds).

De aanvankelijke keus voor *Trametes versicolor* bleek ook niet erg gelukkig te zijn. Het is een snelgroeiende schimmel, maar presteert vooral goed op steriele substraten zoals vers hout. Daarmee is de soort minder geschikt voor gebruik in grond en baggerspecie.

Een andere groep witrotschimmels is meer gespecialiseerd in de afbraak van lignine en cellulose in compost of humusachtige substanties. Deze schimmels zijn beter geschikt om te gebruiken in de reiniging van grond en baggerspecie dan de houtbewonende soorten. Bovendien wees enzymonderzoek (EcoConsult/De Spore/DHV, 1995 ⁶) uit dat in aanwezigheid van stikstof er diverse schimmels zijn die wel tot peroxidase activiteit kunnen overgaan.

Op grond van deze biologische kenmerken is uitgeweken naar alternatieven, zoals *Agaricus bisporus* (champignon) en *Coprinus comatus* (inktzwam). Er waren al eerder dan het onderzoek van DHV aanwijzingen dat champignons in staat moesten zijn PAK af te breken, ondanks het feit dat geen peroxidases werden geproduceerd (Buswell, 1994 ⁴).

Met vele tientallen kg baggerspecie zijn experimenten in speciekuipen op grotere schaal uitgevoerd. In tabel 1 zijn de uitgevoerde experimenten samengevat.

Tabel 1. Experimenten Fungi Farming

Project	Ia	Ib	II	III
Type materiaal	Baggerspecie, veen/zandig	Baggerspecie, veen/zandig	Baggerspecie, klei	Baggerspecie, klei
Verontreinigingstype	PAK, klasse 4. Som 10 VROM: 35-40 mg/kg Som 16 EPA: 45-50 mg/kg	PAK, klasse 4. Som 10 VROM: 35-40 mg/kg Som 16 EPA: 45-50 mg/kg	PAK, klasse 4. Som 10 VROM: 75-100 mg/kg Som 16 EPA: 120-150 mg/kg Minerale olie: ca 1900 mg/kg	PAK, klasse 4. Som 10 VROM: ca 1.200 mg/kg Som 16 EPA: ca 2.000 mg/kg Minerale olie: ca 5700 mg/kg
Schimmelsoort	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Coprinus comatus</i>	<i>Coprinus comatus</i>
Type experimenten	januari-april 1995: -binnen (25 °C) -buiten in de open lucht -buiten onder glas	april-mei 1995: - binnen (25°C) - buiten in de open lucht	mei-augustus 1995: -buiten in de open lucht -buiten onder folie	mei-augustus 1995: -buiten in de open lucht -buiten onder folie
Verblijftijd	80 dagen	55 dagen	90 dagen	90 dagen

In deze kuipen werkt een mengsel van compost, doorgroeid met de voornoemde schimmels, en aan de lucht gedroogde baggerspecie gebracht. Verschillende mengverhoudingen en blanco's (zonder schimmels) werden getest. In totaal zijn 18 experimenten uitgevoerd, waarvan de opzet en de resultaten zijn samengevat in tabel 2. Gemiddeld tweemaal per week is de temperatuur en de vochtigheid van de opstellingen en van de omgeving bepaald. De experimenten binnen werden uitgevoerd bij een temperatuur van 22 tot 25°C. De gemiddelde temperatuur van de experimenten buiten verliep bij project Ia van ca 0°C tot ca 6°C, bij project Ib ca 9°C en bij project II en III ca 17°C.

Bij project Ia en Ib veranderde het vochtgehalte niet sterk in de loop der tijd. In de toplaag vond soms uitdroging plaats, maar door gemiddeld eenmaal per twee weken de mengsels van bovenaf te bevochtigen kon het vochtgehalte op 20 à 30% worden gehouden. Bij project II en III was de uitdroging van de toplaag groter en omdat het hier kleirijke specie betrof, was het zeer moeilijk deze weer te bevochtigen.

In de uitgedroogde toplaag was visueel weinig schimmelactiviteit waarneembaar, daaronder wel. Binnen een week na het mengen van de compost met de specie begon het mycelium door het specie/compostlichaam heen te groeien. Na 2 à 3 weken was het mycelium al redelijk door de specie heen gegroeid. Bij enkele opstellingen is na 3 weken vorming van vruchtlichamen geconstateerd. In de bodem van de bakken waren gaten aangebracht om zodoende het overtollige water uit de bakken te kunnen afvoeren. Dit percolatiewater werd tijdens de proef opgevangen en geanalyseerd. Door combinatie van concentratie en volume kon berekend worden dat minder dan 0,003 µg PAK/kg ds is uitgelooft.

Periodiek zijn monsters van de mengsels genomen over de gehele diepte van de "fungi farms" en na kryogene vermaling geanalyseerd op PAK en organische stof (gloeirest 600 °C). De resultaten van een aantal experimenten zijn opgenomen in tabel 2 en de figuren 3 t/m 5.

Tabel 2. Samenvatting opzet en resultaten experimenten

Opstelling	Type opstelling	Verblijftijd	Eindresultaat		Afnamepercentage m.b.t. PAK	
			PAK (10 VROM)	klasse	VROM-reeks	EPA-reeks
Zand-/venige specie, 35-40 mg PAK/kg droge stof, <i>Agaricus bisporus</i>						
Opstelling 1	Blanco, buiten	80 dagen	43 mg/kg	3	nihil	nihil
Opstelling 2	In de winter in de open lucht	80 dagen	8 mg/kg	2	79 %	79 %
Opstelling 3	In de winter onder glas	80 dagen	11 mg/kg	2	71 %	71 %
Opstelling 4	Binnen	80 dagen	9 mg/kg	2	75 %	76 %
Opstelling 5	Verouderde compost, binnen	80 dagen	6 mg/kg	2	83 %	83 %
Opstelling 6	Blanco, binnen	80 dagen	23 mg/kg	3	35 %	36 %
Opstelling 7	In de lente in de open lucht	55 dagen	8 mg/kg	2	76 %	77 %
Opstelling 8	Binnen	55 dagen	13 mg/kg	3	64 %	63 %
Kleirijke specie, 75-100 mg PAK/kg droge stof, <i>Coprinus comatus</i>						
Opstelling 9	blanco, in de open lucht	90 dagen	69 mg/kg	4	nihil	nihil
Opstelling 10	in de open lucht	90 dagen	15 mg/kg	3	83 %	84 %
Opstelling 11	in de open lucht	90 dagen	2,5 mg/kg	2	> 95 %	> 95 %
Opstelling 12	buiten, onder folie	90 dagen	12 mg/kg	3	84 %	86 %
Opstelling 13	buiten, onder folie	90 dagen	7 mg/kg	2	93 %	93 %
Zwaar vervuilde kleirijke specie, ca 1200 mg PAK/kg droge stof, <i>Coprinus comatus</i>						
Opstelling 14	blanco, in de open lucht	90 dagen	195 mg/kg	4	83 %	81 %
Opstelling 15	in de open lucht	90 dagen	33 mg/kg	3	96 %	96 %
Opstelling 16	in de open lucht	90 dagen	18 mg/kg	2	96 %	97 %
Opstelling 17	buiten, onder folie	90 dagen	49 mg/kg	3	94 %	95 %
Opstelling 18	buiten, onder folie	90 dagen	43 mg/kg	3	91 %	91 %

Er is een duidelijke afname van de PAK-gehalten waarneembaar in de speciesoorten die met witrotschimmels zijn geënt. Deze afname is aanzienlijk overtuigender dan in de blanco opstellingen zonder schimmelenting, waar vrijwel geen afname is geconstateerd. Vooral opvallend is de snelle en grote afname van de PAK-gehalten in sterk kleiige specie, iets dat met "traditionele" landfarming niet voor mogelijk wordt gehouden.

De afnames variëren van 65% tot zelfs meer dan 95%, in een tijdsbestek van 2 à 3 maanden.

Verder blijkt (figuur 5) dat niet alleen de lichte maar ook zware PAK-verbindingen verdwijnen

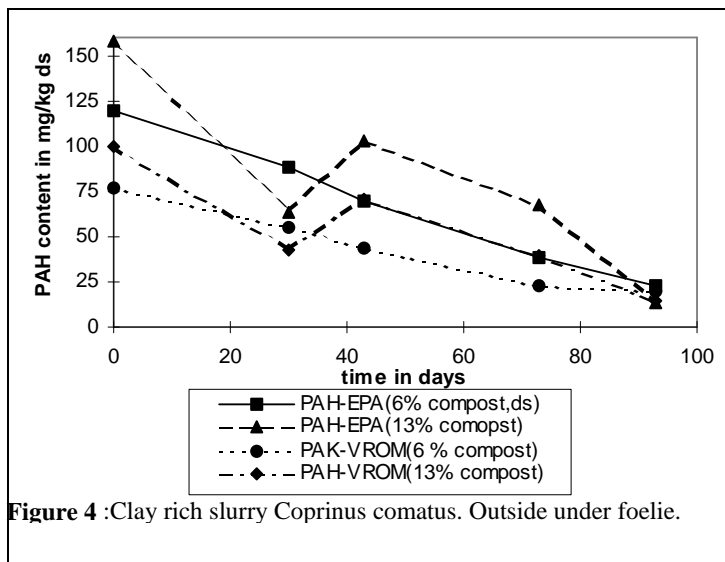


Figure 4 :Clay rich slurry *Coprinus comatus*. Outside under foelie.

Omdat de specie van de project II en III (polderwateren omgeving Sluiskil) naast PAK ook nog verontreinigd was met olie zijn van enkele opstellingen tevens de gehalten aan minerale olie bepaald aan het begin en eind van de fungi farm-periode. Het gehalte aan minerale olie, zowel de lichte als de zware fracties, is drastisch gedaald. Terwijl het gehalte aan minerale olie in de blanco (open lucht) nagenoeg constant is gebleven rond de 1900 mg/kg, was na 13 weken het gehalte aan minerale olie in opstelling 12 en 13 gedaald tot 200 resp. 75 mg olie per kg. Dit betekent een afname van 90 à 95%. Bij project III is ook een dergelijke daling geconstateerd in het gehalte aan minerale olie.

Discussie

Geconcludeerd worden dat niet alleen de peroxidase enzymen tot PAK afbraak in staat zijn. De schimmeltechnologie biedt goede mogelijkheden voor on site behandeling van verontreinigde grond en baggerspecie, vooral als gebruik gemaakt kan worden van in grote hoeveelheden doorgegroeide (afval)compost van de commerciële schimmelteelt.

Jaarlijks worden vele tienduizenden tonnen van deze compost geproduceerd. Na gebruik geeft dit een groot afvalprobleem. Door dit afval te gebruiken, wordt voorzien in de oplossing van twee problemen:

- reiniging van met PAK en/of olie verontreinigde specie of grond
- hergebruik van afval in plaats van storten

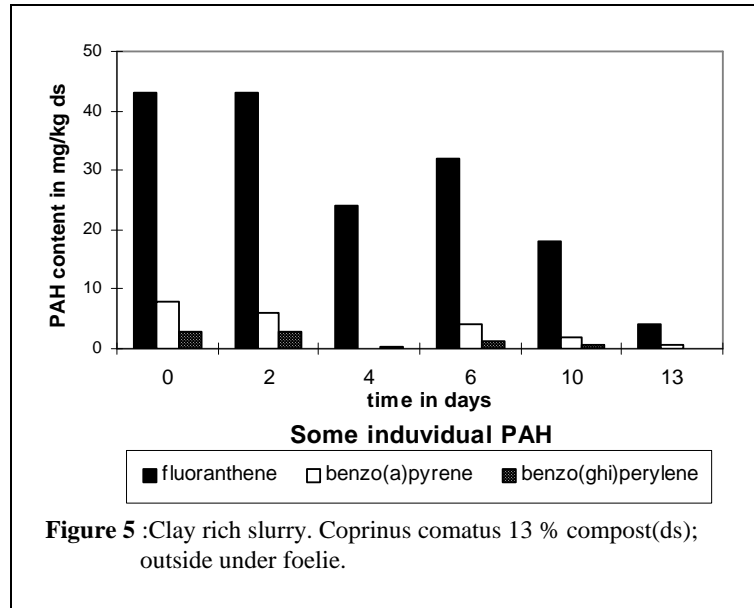


Figure 5 :Clay rich slurry. Coprinus comatus 13 % compost(ds); outside under foelie.

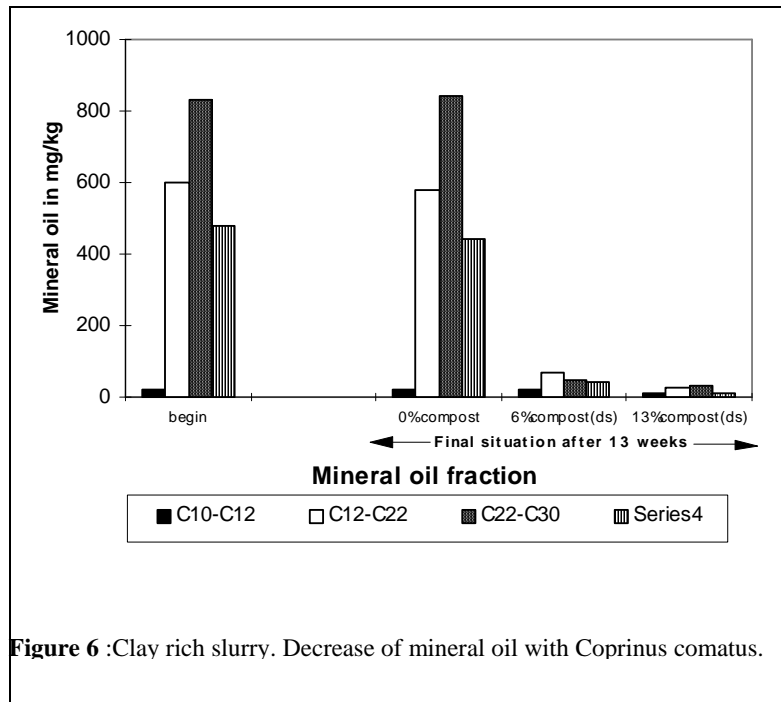


Figure 6 :Clay rich slurry. Decrease of mineral oil with Coprinus comatus.

Het huidige waterbodembeleid (ministerie van Verkeer en Waterstaat, 1994¹³) geeft aan dat baggerspecie die valt in de klassen 3 en 4 niet op de waterkant mag worden verspreid, maar moet worden gereinigd of worden geborgen in depots. Vanwege de hoge kosten en onvoldoende depotcapaciteit ondervindt dit beleid nog weinig uitvoering. In de gevallen waar PAK de verontreiniging vormen, zou de schimmeltechnologie een oplossing kunnen bieden.

De specie wordt dan, waar het kleine wateren betreft en voldoende ruimte beschikbaar is, op de oever behandeld en binnen één seizoen op het niveau van klasse 2 gebracht. Conform het huidige waterbodembeleid mag deze specie dan verder op de oever verspreid worden. Eventueel zou de specie behandeld kunnen worden in

tussendepots.

Thans wordt in NOBIS-verband de schimmeltechnologie verder ontwikkeld: opschaling voor PAK en minerale olie en ontwikkeling van de degradatie van complexe gehalogeneerde verbindingen.

Geraadpleegde bronnen

Morgan, P., T.S. Lewis and R.J. Watkinson. Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. (1991) 34: 693-696.

Barclay, D.B., R.L. Legge and G.F. Farquhar. Modelling the growth kinetics of *Phanerochaete Chrysosporium* in submerged static culture. In: Applied and Environmental Microbiology, 1993 (Vol. 59), p. 1887-1892. American Society for Microbiology.

Brodkorb T.S. and R.L. Legge. Enhanced biodegradation of phenantrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete Chrysosporium*. In: Applied and Environmental Microbiology, 1992 (Vol. 58), p. 3117-3121. American Society for Microbiology.

Buswell, J.A. Potential of spent mushroom substrate for bioremediation purposes. Compost Science & Util. (1994) 31-36.

DHV Milieu en Infrastructuur BV. Landfarming van baggerspecie. In opdracht van de Projectgroep Ontwikkeling Saneringsprocessen Waterbodems. Lelystad (1991), RIZA-nota 91.063.

Stichting Ecoconsult, Broedbedrijf De Spore (Nijmegen, 9 november 1995). Eindrapportage enzym-analyse en bodemdoor groei experimenten. In opdracht van DHV Milieu en Infrastructuur BV.

Adviesbureau Interproject. Vergelijkbaarheid analyseresultaten waterbodemmonsters. In opdracht van de Projectgroep Ontwikkeling Saneringsprocessen Waterbodems. Lelystad (1991), RIZA-nota 92.035.

DHV Milieu en Infrastructuur BV, Hoogheemraadschap van Amstel en Vecht. Fungi Farming®. Toepassing op baggerspecie uit de regio Amstel en Vecht. Amersfoort (juli 1995), rapport MT-BD953860.

DHV Milieu en Infrastructuur BV, Waterschap de Drie Ambachten. Fungi Farming®. Toepassing op zwaar verontreinigde kleirijze baggerspecie uit de regio Sluiskil. Amersfoort (augustus 1995), rapport MT-BD954598.

J.A. Field, E. de Jong, G. Feijoo-Costa and J.A.M. de Bont. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. In: Applied and Environmental Microbiology, July 1992 (Vol. 58, no 7), p. 2219-2226. American Society for Microbiology.

J.A. Field, E. de Jong, G. Feijoo-Costa and J.A.M. de Bont. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. In: TIBTECH, february 1993 (Vol. 11), p. 44-49. Elsevier Science Publishers Ltd (UK).

E.E.J. Kaal, E. de Jong, J.A. Field. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain bos55. In: Applied and Environmental Microbiology, dec. 1993 (Vol. 59, no 12), p. 4031-4036. American Society for Microbiology.

Ministerie van Verkeer en Waterstaat. Evaluatie Nota Water. 1994.

Sack, U., T. Günther, W. Schade and W. Frische. Screening of fungi for ability of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In: Microbiol. Reinig. Boeden (1994) 119: 124309. Editor(s): Behrebs, D. en J. Wiesner. Publisher: DECHEMA, Frankfurt/Main, Germany.

[F:\PROJ\55310-31.021\WP\FUNGFARM.bo3]