

Asbestverwijdering met schimmels
Haalbaarheidsstudie op labschaal

Titel

Asbestverwijdering met schimmels

Pagina's

1

Trefwoorden

Asbest, schimmels, afbraak

Samenvatting

Uit het eerdere asbestonderzoek bij Deltares blijkt dat asbest door schimmels en hun metabolieten kan worden afgebroken. Het grote effect van oxaalzuur werd ook gedemonstreerd, zoals ook bekend was uit de literatuur. In deze studie is verder op deze kennis voortgebouwd en zijn de relevante processen verder bestudeerd om te komen tot een proefpilot.

In dit onderzoek hebben we de beste condities bepaald om de schimmels te laten groeien en ze asbest af te laten breken. Door te werken met PDB (Potato Dextrose Broth) medium, is deze afbraak verbeterd en wordt de groei van schimmels verhoogd en versneld. *A. niger* had de hoogste asbestafbraakactiviteit in vergelijking met de andere bestudeerde schimmels. Deze activiteit wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door de hoge productie van zuren, waarvan oxaalzuur het sterkst degraderende effect lijkt te hebben. Er werd ook aangetoond dat beweging (rollen) de groei van schimmels bevordert en een positief effect heeft op de asbestdegradatie.

Na deze studie moeten verschillende experimenten worden uitgevoerd. Asbestcementafbraak moet onder dezelfde omstandigheden als het experiment met flesjes en chrysotiel worden bestudeerd. Op deze manier worden de beste omstandigheden voor de asbestcementafbraak gedemonstreerd. Pilot proeven kunnen dan worden uitgevoerd met behulp van cementmixers onder de stop-and-go toestand (1 uur draaien voor 5 uur stoppen). Daarbij kan het effect van de twee schimmels en citroen- en oxaalzuur op chrysotiel besmette grond en asbestcement op grote schaal bestudeerd.

Versie	Datum	Auteur	Paraaf	Review	Paraaf	Goedkeuring	Paraaf
	sep. 2017	S. Jansen					
		J. Gerritse					

Status

concept

Dit document is een concept en uitsluitend bedoeld voor discussiedoeleinden. Aan de inhoud van dit rapport kunnen noch door de opdrachtgever, noch door derden rechten worden ontleend.

Inhoud

1 Inleiding	3
1.1 Aanleiding	3
1.2 Doelstelling	3
2 Literatuur	4
2.1 Asbestafbraak door schimmels: algemeen	4
2.2 Beschikbaar maken asbestcement voor afbraak asbest	5
2.3 Bodem onder asbestdaken	7
2.4 Optimaliseren asbestverwijdering door schimmels	8
3 Materiaal en methoden	9
3.1 Voorstudie: screening afbraak van asbest door schimmels	9
3.2 Optimalisering van groeiomstandigheden voor asbestafbraak door schimmels in grond	10
3.2.1 Schimmels en groeiomstandigheden	10
3.2.2 Schimmelgroei in grond	11
3.3 Afbraak van asbestcement	1
3.3.1 Zuurtitratie van asbestcement	1
3.3.2 Asbestcement in kolommen	1
3.3.3 Asbestcement in baffled bottles	4
3.4 Afbraak van chrysotiel in grond	5
3.5 Analyse van door schimmels geproduceerde stoffen	6
3.5.1 Sideroforen	6
3.5.2 Gasmeting	7
3.5.3 Zuren, magnesium en calcium	7
4 Resultaten	8
4.1 Voorstudie: screening asbestafbraak met schimmels	8
4.2 Optimalisering van groeiomstandigheden voor asbestafbraak door schimmels in grond	26
4.2.1 Schimmelkeuze	26
4.2.2 Vochtigheid	26
4.2.3 Media	26
4.3 Afbraak van asbestcement	29
4.3.1 Selectie van zuur voor afbraak van asbestcement en bufferen	29
4.3.2 Asbestcement in kolommen	30
4.3.3 Asbestcement in baffled bottles	32
4.4 Afbraak van chrysotiel in grond	35
4.4.1 Invloed van mengregime	35
4.4.2 Afbraak van chrysotiel in grond	38
5 Ontwerp van een veldpilot	41
6 Conclusies	41
Referenties	42
Bijlagen	Error! Bookmark not defined.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

De Nederlandse overheid heeft in het kader van het nationale bodemsaneringsprogramma geld voor het uitvoeren van asbestsaneringen beschikbaar gesteld. Gangbare methoden voor asbestsanering zijn duur vanwege de vele veiligheidsmaatregelen die genomen moeten worden genomen. Een behandeling van het asbest waarbij dit minder schadelijk wordt gemaakt kan dan ook voor grote kostenbesparing zorgen.

In de literatuur zijn voorbeelden bekend van vermindering van de toxiciteit van asbest onder invloed van schimmels en korstmossen. Het gaat hierbij om laboratoriumexperimenten, waarbij de potentie wordt uitgesproken voor inzetbaarheid voor bioremediatie.

Het uitgevoerde onderzoek had tot doel te onderzoeken of deze kennis verder ontwikkeld kan worden tot een praktisch saneringsconcept.



Figuur 1.1 Verwijdering van asbestdaken.

1.2 Doelstelling

1. Hoe kan asbestcement beschikbaar worden gemaakt voor afbraak door schimmels?
2. Hoe kunnen asbestvezels die via afspoeling van asbestdaken in de bodem zijn terechtgekomen, worden afgebroken met behulp van schimmels?
3. Hoe kan kennis over afbraak van asbest met schimmels worden opgeschaald naar de praktijktoepassingen?

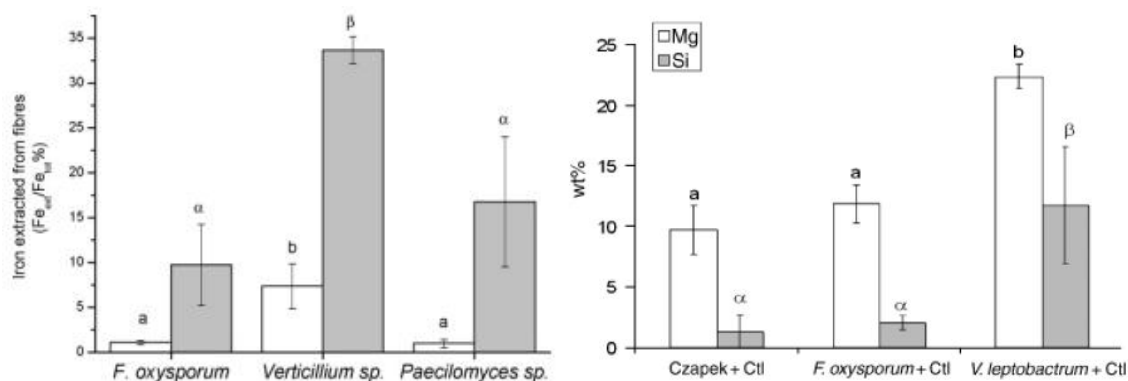
Het voorgestelde onderzoek heeft als doel om voor de eerdergenoemde vragen een proof-of-principle uit te voeren. De stappen zijn voor alle onderzoeksvragen globaal als volgt:

- Wat is er uit eerder onderzoek naar asbestafbraak bekend? Wat werkte wel, wat werkte niet?
- Welke aanpak kan hieruit worden gedistilleerd als kansrijk?
- Beoordeling van de kansrijkheid van deze aanpak met een experiment.

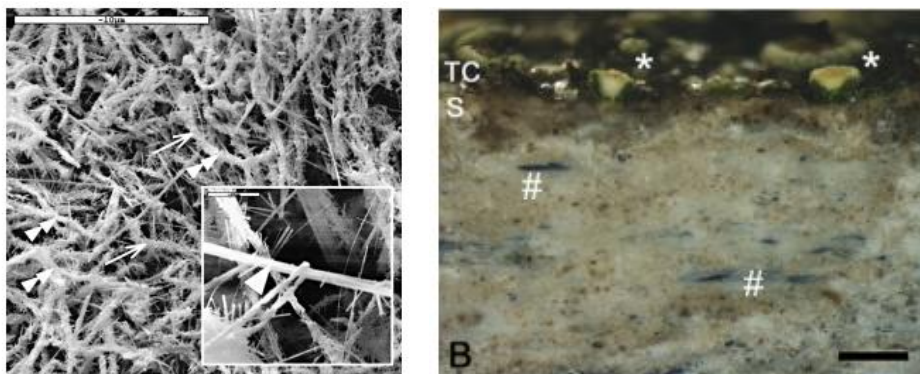
2 Literatuur

2.1 Asbestafbraak door schimmels: algemeen

Sinds 2006 is een aantal experimenten gerapporteerd over biologische processen die asbest minder schadelijk maken. Schimmels zijn in staat de schadelijkheid van asbest te verminderen. Twee mechanismen worden genoemd: 1. IJzer-, magnesium- en siliciumionen uit het asbest worden gebonden door middel van metaalbindende stoffen (siderophoren) die de schimmels uitscheiden (orde-groottes: 7 % uit crocidoliet en 34 % uit chrysotiel door een *Verticillium* sp.); 2. De schimmels immobiliseren asbestvezels. Een aantal schimmelsoorten heeft hiervoor hoge potentie (*Fusarium oxysporum* (Martino 2004), *Verticellum*, *Paecilomyces* en *Aspergillus* spp. (Daghino 2006)). Deze effecten treden vooral op bij crocidoliet (blauw asbest) maar ook bij chrysotiel (wit asbest). Het reducerend effect van deze schimmels op de toxiciteit is gedemonstreerd aan de hand van testen met schade aan kalf thymus DNA en het effect op de vrije radicalen uit het asbest (Daghino 2006).



Figuur 2.1 Links: Fe extractie uit chrysotiel (gewone letters) en crocidoliet (griekse letters) (Daghino et al., 2006); rechts: Mg en Si extractie uit chrysotiel (Daghino et al., 2009).



Figuur 2.2 Links: Schimmeldraden met asbestvezels (Martino et al., 2004); rechts: korstmossen op asbest (Favero-Longo et al., 2009).

Naast schimmels worden ook effecten van korstmossen (een korstmos is een symbiose tussen een alg en een schimmel) op asbesttoxiciteit beschreven (Favero-Longo et al., 2013; Favero-Longo et al., 2009). Een onderzoek naar korstmossen op asbestcement daken liet zien dat een bedekking met 25% aan korstmossen de fysische en chemische eigenschappen van asbest cement die chrysotiel en crocidoliet bevat beïnvloedt. Het loskomen van vezels is significant lager (ca. 30%) bij bedekking met korstmossen. Onder de korstmossen met de grootste

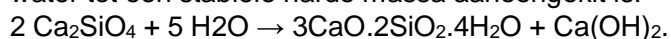
bedekking (*Acarospora cervina*, *Candelariella* ssp.) worden chrysotiel en crocidoliet opgelost (Favero-Longo, 2009). Bij een ander onderzoek bleek oxaalzuur, een stof die lijkt op de stoffen die korstmossen kunnen uitscheiden, te zorgen voor gedeeltelijke of zelfs volledige inactivatie van het oppervlak. Hetzelfde proces zou door de korstmossen zelf kunnen worden veroorzaakt (Favero-Longo, 2012).

2.2 Beschikbaar maken asbestcement voor afbraak asbest

Veel van het aanwezige asbest komt voor in de vorm van asbestcementen daken. Bij de afbraak hiervan is een knelpunt dat slechts een klein deel van het asbest beschikbaar is: het grootste deel is ingebed in het cement. Voor effectieve afbraak van asbest door schimmels moet het asbest in het cement beschikbaar worden gemaakt. Dit kan door verkleining van het asbestcement, of door het oplossen van het cement rondom de asbestvezels.

TNO rapport R2004/523 geeft informatie over de samenstelling van verschillende asbestcementmaterialen. De belangrijkste asbestcomponent is chrysotiel (10-15%), bij dikke platen komt daarnaast soms 2-5% crocidoliet voor. In asbestcement leidingen kunnen de gehalten hoger liggen (15-30% chrysotiel, soms 2-5% of 5-10% crocidoliet).

Cement bestaat voornamelijk uit calciumwaterstofsilicaat, waarmee asbestvezels na mengen in water tot een stabiele harde massa aaneengekit is:



Er zijn verschillende methoden voor verwerking van asbestcement (Tempelman, 2016):

1. transporteren naar een stortplaats en met grond afdekken (standaard);
2. afbraak:
 - a) thermische afbraak (chrysotiel: > 600 °C; amfibool: 1100 °C);
 - b) chemische afbraak: behandeling met zuur of loog;
 - c) chemische afbraak: verglazen in glassmelt;
 - d) alternatieve verhittingsmethoden: microgolf, laser.

Aan alle genoemde afbraakmethoden zitten voor- en nadelen:

a) Thermische afbraak:

Voordelen:

1. Alle asbest wordt, mits voldoende hoog verhit, afgebroken;
2. Kan grootschalig worden opgezet;
3. Proces kan worden gevalideerd/gecertificeerd;
4. Veel ervaring met proces (o.a. REEF, AVR, SITA).

Nadelen:

5. Kostbaar: kost veel energie;
6. Transport naar centrale locatie nodig;
7. Eindproduct moeilijk te sluiten;
8. Risicobeleving omwonenden.

b) Chemische afbraak (zuur of loog)

Voordelen:

1. Alle asbest wordt, mits goed uitgevoerd, afgebroken;
2. Proces kan worden gevalideerd/gecertificeerd.

Nadelen:

1. Agressieve chemicaliën nodig;
2. Arbo/milieu bij verwerking;
3. Chemisch vervuild eindproduct;
4. Moeilijk grootschalig uit te voeren.

c) Chemische afbraak: verglazen in glassmelt

Voordelen:

1. Alle asbest wordt, mits goed uitgevoerd, afgebroken;
2. Verscheidene processen al gevalideerd en gecertificeerd;
3. Procedures bekend (o.a. Vitrifix, Sorg);
4. Eindproduct bestaat uit glasbrokken (o.a. bruikbaar in wegebouw).

Nadelen:

1. Kostbaar: kost veel energie;
2. Arbo bij aanlevering en verwerking;
3. Moet grootschalig worden toegepast;
4. Capaciteit relatief gering i.v.m. verhouding glassmelt en maximum hoeveelheid asbestafval daarin.

d) Alternatieve verhittingsmethoden: microgolf, laser, inductie.

Voordelen:

1. Alle asbest wordt, mits goed uitgevoerd, afgebroken;
2. Kan kleinschalig op locatie worden uitgevoerd;
3. Transport wordt vermeden;
4. In de toekomst kansrijk, mits professioneel aangepakt.

Nadelen:

1. Verkeert nog in experimenteel stadium (o.a. project in Polen en V.S.);
2. Nog geen validatieresultaten beschikbaar;
3. Vertaalslag naar de praktijk nog niet gemaakt ('Willie Wortel stadium').

Gangbare verkleining van (asbest)cement vindt plaats door vermalen. Nadeel van het vermalen van asbestcement is dat dit energie kost.

Verder zijn de volgende fragmenteringstechnieken voor handen (www.wtcb.be):

1. Thermisch
2. Elektrisch
3. Smart concrete crushing.

Er is Italiaans onderzoek gedaan naar het onschadelijk maken van asbesthoudend cement door vermalen (Pescia et al., 2003; Colangelo et al., 2011). Deze methode lijkt al in korte tijd asbestcement onschadelijk te kunnen maken (chrysotiel na 4 minuten, amphibolen na 8-12 minuten).

Asbestdaken verweren snel onder invloed van kippenmest (TNO, 2007). Het kan een idee zijn om kippenmest of ammoniak in te zetten om degradatie van asbestcement te versnellen.

Oplossen van asbestcement door micro-organismen

Er is geen literatuur gevonden over het biologisch oplossen van asbestcement. Dit suggereert dat dit een volstrekt nieuw concept zou zijn. Bekend is wel dat micro-organismen in zijn staat om calcium en silicium mineralen, de hoofdcomponenten van cement, op te lossen (Gadd, 2007; Gadd, 2010; Wei, e.a. 2013). Een berucht voorbeeld is de biocorrosie van gebouwen en beelden. Belangrijke processen hierbij zijn:

- Productie van Ca^{2+} bindende stoffen (chelatoren) zoals oxalaat en citraat en hydrofiële gelen door schimmels en korstmossen. Een lage pH (<5) is gunstig voor het in oplossing gaan van calcium oxalaat. Hiernaast kunnen schimmels een breed spectrum aan metaal-bindende stoffen uitscheiden zoals sideroforen, aminozuren en fenolen. Schaarste aan nutriënten is een belangrijke trigger voor de productie van chelatoren door schimmels.
- Productie van organische zuren door schimmels en bacteriën. Voorbeelden zijn: oxaalzuur, citroenzuur, mierenzuur, koolzuur, melkzuur, boterzuur, malonzuur, wijnsteenzuur, azijnzuur,

barnsteenzuur, fumaarzuur, druivenzuur, propionzuur en gluconzuur. Door zuurvorming kan een pH verlaging tot beneden pH 2, wat ook weer gunstig is voor de chelerende werking van oxalaat.

- Productie van anorganische zuren door bacteriën. Hierdoor kan de zuurgraad dalen tot pH 1,5. Voorbeelden zijn: protonen (H^+), waterstofsulfide (H_2S) door sulfaat-reducerende bacteriën, zwavelzuur (H_2SO_4) door zwavel-oxiderende bacteriën en salpeterzuur (HNO_3) door nitrificerende bacteriën (Turick and Berry 2016). Het oplossen van cement door het direct doseren van zuur (bijvoorbeeld zwavelzuur, zoutzuur of salpeterzuur) lijkt echter eenvoudiger dan gebruik van bacteriën hiertoe.

Afbraak van cement door schimmels gaat sneller dan door bacteriën (Gadd, 2007; Gadd, 2010). Het oplossen van silicaten gaat beter met organische zuren dan met anorganische zuren (Ehrlich, 1996). Voorbeelden van cement-oplossende schimmels zijn *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Amorphotheca*, *Aureobasidium* en *Cladosporum*. Organische zuren vormende schimmels die op gebouwen en beelden groeien zijn voor hun groei afhankelijk van de beschikbaarheid van nutriënten. Deze kunnen ze deels uit bouw materiaal zelf halen, door deze op te lossen (b.v. calcium, magnesium, fosfor en zwavel). Voor gebonden stikstof (b.v. nitraat, ammonium) leven de schimmels veelal in synergie met cyanobacteriën (blauwalgen) die stikstofgas uit de lucht binden. Schimmels zijn in staat om door zuurvorming gaten in rotsen en stenen te boren en er diep in door te dringen. Dit gaat sneller naarmate een materiaal meer poreus is, of wordt. Afbraak van bouwmaterialen is onder normale omstandigheden echter een proces dat eeuwen duurt (denk aan de Griekse en Romeinse beelden). Hij is wel aannemelijk dat dit proces sterk versneld kan worden, bijvoorbeeld door bevochtigen en bemesten met stikstof. Onze experimenten met asbestcement kunnen een indicatie geven of een dergelijke stimulering kan leiden tot het voldoende snel oplossen van cement en het vrijmaken van asbest, om hierop een biologische aanpak te baseren.

2.3 Bodem onder asbestdaken

De bodem onder asbestdaken vormt een potentiële locatie met bodemverontreiniging omdat hier veel asbestvezels terecht komen die door verwerking vrijkomen uit de asbestdaken. Er is nog geen standaardoplossing voor deze bodemverontreiniging. Dit onderdeel van het project richt zich op het ontwikkelen van een kosteneffectieve manier van afbraak van asbest in de bodem onder asbestdaken.

De richtlijnen voor asbest in de bodem zijn verwoord in de Wet bodembescherming. Er is sprake van ernstige verontreiniging wanneer de gemiddelde concentratie binnen een ruimtelijke eenheid hoger is dan de interventiewaarde van 100 mg/kg d.s.

In TNO rapport TNO TR 2007/420 is de kennis op dat moment over emissie van asbest uit asbestdaken door verwerking en corrosie samengevat. Daaruit bleek dat vooral bij oudere daken (15-20 jaar en ouder) veel verwerking optreedt en emissie van asbest plaatsvindt. Emissie via regenwater (80%) is groter dan via lucht (20%). In slib in dakgoten onder asbestcement dakplaten wordt vrijwel altijd een hoog gehalte asbest aangetroffen. Dit is aanwezig in een combinatie van flinters asbestcement, vezelbundels en vezels. Het percentage asbest dat aanwezig is in het slib is afhankelijk van de verwerkingsgraad van de asbestcement dakplaten en varieert van 0,1 tot 10 gewichtsprocent met een gemiddeld asbestpercentage van ca. 3 gewichtsprocent.

In 2014 is door Geofox een onderzoek gepubliceerd naar het voorkomen van asbest in grond onder asbestdaken (Geofox, 2014). In de provincies Overijssel en Gelderland zijn elk 10 locaties onderzocht. Per locatie zijn de daken en de afwateringszones onder die daken onderzocht.

De uitkomsten zijn:

- Op alle 20 locaties is visueel geen, maar analytisch wel asbest in de bodem van de afwateringszone aangetroffen;
- Op 45 % van de locaties wordt de interventiewaarde (100 mg/kg d.s. gewogen) uit de Wet bodembescherming overschreden;
- Op 45% van de locaties zijn hoeveelheden vezels aangetroffen die het criterium van 10 mg/kg d.s (gewogen) overschrijden;

- Bij 65% van de locaties wordt de Interventiewaarde en/of het toetsingscriterium voor spoedeisendheid overschreden.

De kleefmonsters van de daken geven op een enkele uitzondering na allemaal het resultaat ++, hetgeen betekent dat vezels vrij kunnen komen uit de (verweerde) daken.

De belasting met asbest lijkt zich te beperken tot een zone van circa 1 meter breed en 10 cm diep.

Uit een meer algemene database (niet alleen bodem onder asbestdaken) van Eurofins blijkt dat een zeer klein deel van de bodems hoge concentraties asbest bevat. Het lijkt er dus op dat bodems onder asbestdaken een specifieke groep vormt van bodems met verhoogde asbestconcentratie.

In TNO rapport R2002/078 is onderzocht hoe groot de risico's van asbesthoudende grond in Nederland zijn. Daartoe zijn onder andere simulatieproeven met asbesthoudende grond gedaan om te onderzoeken hoe groot de blootstellingsrisico's voor gebruikers zijn. De beschreven proefopzet biedt nuttige handvaten voor experimenten naar de afbraak van asbest in bodem in dit project.

De simulatieproeven lieten zien dat de blootstellingsrisico's beperkt zijn: onder de toegepaste 'worst case' omstandigheden (droge zandgrond in combinatie met vrijwel ongebonden amosiet-asbest) wordt pas een asbestvezelconcentratie in de lucht gemeten boven de ca. 5 mg/kg. Vochtigheidsgraad en bodemactiviteit hebben invloed op het blootstellingsrisico. Een bodemvochtigheid van 5-10% kan de asbestvezelemissie terugbrengen met een factor 10-20. Er is een minimale bodemactiviteit nodig om asbestvezels in de ademzone te brengen. De vezelconcentratie neemt vanaf deze minimale bodemactiviteit exponentieel toe met verder toenemende bodemactiviteit. Type asbest en type grond heeft ook invloed op asbestvezelemissie, maar minder dan vochtigheidsgraad en bodemactiviteit.

Sanering van asbesthoudende grond houdt nu vaak in: zeven en bezinken en is vooral gericht op asbestcement in grond.

2.4 Optimaliseren asbestverwijdering door schimmels

In algemene zin is de afbraak van mineralen onder invloed van schimmels goed bekend (Gadd, 2004, 2007, 2010, 2012). Hierbij spelen meestal de stoffen die schimmels uit kunnen scheiden een belangrijke rol. De schimmels produceren deze stoffen om stoffen uit de mineralen vrij te maken die zij nodig hebben voor hun groei, bijvoorbeeld ijzer of magnesium. Een van de stoffen die schimmels hiervoor kunnen uitscheiden is oxalaat. Hieruit is het idee ontstaan om oxalaat toe te dienen, soms in combinatie met ultrasoonbehandeling of zuur (Turci, 2007, 2008, 2010, Rozalen, 2013, 2014; Lee, 2015; Valouma et al., 2015). Ook natuurlijk voorkomende zuren kunnen leiden tot chrysotielafbraak (Holmes et al 2014; Lavkulich et al., 2014). Van de onderzochte methoden blijkt oxalaat zeer effectief. Deze methode leidt tot snelle afbraak, en het product is voornamelijk amorf silica (Turci, 2010).

Een andere vorm van verwijdering van chrysotiel is reactie met CO₂, eventueel in combinatie met oxalaat en acetaat (Gadikota, 2014; McCutcheon, 2016).

3 Materiaal en methoden

Er lijken mogelijkheden te zijn voor bio-remediatie door schimmels en korstmossen, echter, de resultaten komen van kleinschalige laboratoriumexperimenten. Om een inschatting te maken van het potentieel voor praktijktoepassing moeten de volgende vragen worden beantwoord:

- Hoe groot is het effect van schimmels en korstmossen op de schadelijkheid van asbest, en hoe snel is deze werking?
- Welke typen asbest of asbesttoepassing lenen zich hiervoor?
- Welke organismen lenen zich hiervoor?
- Wat zijn mogelijke bijeffecten van deze organismen?
- Wat is de praktische toepasbaarheid?

Bij de praktijktoepassingen denken we aan het onschadelijk maken op stortplaatsen met mogelijk hergebruik van grondstoffen, het behandelen van daken voor verwijdering, het behandelen van asbest wegen, verontreinigde bodem, etc.

In eerste instantie is toepassing op asbestdaken en wellicht het saneren van asbest ten gevolge runoff (regenwater) daarvandaan in de bodem het meest relevant, met name voor daken zonder goot omdat dit een groot maatschappelijk probleem is op dit moment: alle asbestcement-daken moeten voor 2024 zijn verwijderd. De meeste asbestcement-daken bevatten alleen chrysotiel (10-15%). Daken met grote overspanning kunnen daarnaast ook nog ca. 5-10% crocidoliet bevatten. Er groeit vrijwel altijd mos op deze daken. Dit mos groeit vooral op de noordzijde, aangezien de daken aan de zuidkant 's zomers erg heet kunnen worden (> 800 C). Het is de ervaring dat door verwerking vooral de cementbestanddelen worden uitgeloozd, waardoor de asbestconcentratie juist toeneemt. "Iets" dat een krachtige complexvormer voor Mg produceert zou een goed begin kunnen zijn.

3.1 Voorstudie: screening afbraak van asbest door schimmels

In november 2015 is een brede screening ingezet naar de potentie van schimmels voor de afbraak van asbest (zie bijlage A).

In deze haalbaarheidsstudie zijn eenvoudige blootstellingstesten van asbestvezels aan schimmels uitgevoerd. Door meting van ijzer, magnesium, asbest vezels (SEM-EDX) is onderzocht of de asbest werd afgebroken.

Er is een selectie van blootstellingsmatrices toegepast:

- *Fusarium oxysporum*
- *Purpureocillium lilacinum*
- *Aspergillus niger*
- *Verticillium leptobactrum*
- Mix van schimmels 1 t/m 4
- Oxaalzuur
- Blanco.

De criteria voor deze selectie waren:

- Bekend uit literatuur over asbest afbraak
- Potentie voor oplossen componenten uit asbest
- Niet gevaarlijk
- Makkelijk te kweken.

De toegepaste asbestsoorten waren:

1. Chrysotiel
2. Crocidoliet
3. Asbest cement
4. Geen asbest (blanco).

Tabel 3.1 vat de opzet van deze experimenten samen.

Tabel 3.1 Opzet van screening asbestverwijdering door schimmels. De nummers geven de nummering van de combinatie asbestvorm/schimmelsoort.

	<i>Fusarium</i>	<i>Purpureo cilium</i>	<i>Asper gillus</i>	<i>Verti cillum</i>	Mix	Oxaal zuur	-
Chrysotiel	1	2	3	4	5	6	7
Crocidoliet	8	9	10	11	12	13	14
Asbest cement	15	16	17	18	19	20	21
-	22	23	24	25	26	27	28

Alle incubaties zijn in duplo uitgevoerd.

Deze experimenten zijn in de volgende stappen uitgevoerd:

- 20 november 2015: start incubaties
- december 2015 (13 dagen): bemonstering oplossing van 6 flesjes: opgeloste ionen
- 24 december 2015 (34 dagen): bemonstering oplossing alle flesjes: opgeloste ionen
- februari/maart 2016: bemonstering van een aantal flesjes: schimmels + asbest (zie presentatie TNO)
- oktober 2016: bemonstering oplossing van alle flesjes: opgeloste ionen.

Door TNO is in februari/maart 2016 per type asbest (inclusief asbestcement) een analyse uitgevoerd van:

- 1x blanco
- 1x schimmelcultuur
- 1x oxaalzuur.

Deze analyse omvatte:

- Stereo lichtmicroscopie (LM): globale beoordeling;
- Polarisatiemicroscopie (PLM): kristallijne vorm vezels;
- Elektronenmicroscopie met röntgenmicroanalyse (SEM/EDX): morfologie en elementsamenstelling vezels en afbraakproducten.

Daarnaast zijn de incubaties regelmatig visueel geïnspecteerd, en zijn de mogelijkheden van toxiciteitstesten verkend.

3.2 Optimalisering van groeicondities voor asbestafbraak door schimmels in grond

3.2.1 Schimmels en groeimedia

De bestudeerde schimmels zijn: 1. *Aspergillus niger* DTO146E8, 2. *Verticillium leptobactrum* CBS 123143, 3. *Aspergillus creber* (geïsoleerd uit een MES-oplossing met een stuk asbestcement) en 4. een onbekende schimmel die werd geïsoleerd uit een PDB-oplossing met een stuk niet-gewassen asbest-cement dak. De eerste twee stammen werden verstrekt door het Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.

Glucosemedium werd gebruikt als arm medium voor de schimmelcultuur, met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 g/L (Sigma), NaCl 2,0 g/L (Merck), sporen oplossing (Zn, Cu) 2X standaard, gist extract 0,2 g/L (Difco), D-glucose 0,3% (w/v) 6,0 g/L (Fisher Scientific), KH_2PO_4 2,0 g/L (Sigma), biotine en thiamineoplossing 0,002 g/L elk (Sigma-Aldrich), pH 6,2. Als een goedkoop rijk medium werd Potato-Dextrose-Broth (PDB) bereid uit een mengsel van 200 g/L gewassen en geschilde gekookte aardappel en saccharose / sucrose 20 g/L. Potato-Dextrose-Agar (PDA) (Difco) platen werden bereid door het protocol van de leverancier te volgen voor het isoleren en groeien van de verschillende schimmelsoorten. Alle experimenten werden uitgevoerd bij kamertemperatuur (20°C).

Voor de experimenten met grond werden twee soorten bodem gebruikt: grond 1 met 100% droog zand (Decor, korrelgrootte < 1 mm, 7 maal gewassen met milliQ water om een geleidbaarheid van 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ te bereiken) en bodem 2 met 87,5% droog zand en 12,5% cactus grond (Pokon).

Het asbest was van twee verschillende types: asbestcement dat afkomstig was van een dak samengesteld uit cement- en chrysotielvezels, en pure chrysotielvezels afkomstig uit een asbest touw.



Verticillium leptobactrum



Aspergillus niger

Figuur 3.1 Twee schimmels gebruikt voor experimenten naar afbraak van asbest in grond en van asbestcement.

3.2.2 Schimmelgroei in grond

De invloed van verschillende vocht- en bodemomstandigheden op de groei van schimmels is onderzocht. Bodem 1 en 2 werden (niet-steriel) bij kamertemperatuur geïncubeerd in 250 ml batchflessen met 20% (w/w), 30%, 35% of 40% vocht door verschillende hoeveelheden glucose medium toe te voegen.

De groei van *A. niger* en *V. leptobactrum* werd vervolgens onder de eerder beschreven omstandigheden bestudeerd (steriel en niet-steriel), en alleen met 20% en 40% vocht (door toevoegen van glucose medium of PDB). De schimmels aan de batchflessen toegevoegd als een klein stukje schimmel van PDA-platen.

Om te testen hoe de schimmels bij bewegen zouden overleven en groeien, werden batches bereid met 20 g grond (steriel en niet-steriel) 14 ml PDB en geïnoculeerd met 106 sporen *A. niger*, *V. leptobactrum*, de onbekende schimmels en *A. niger* en *V. leptobactrum* samen. Deze mengsels werden afgesloten met silicium septa en op een rotor geplaatst met een snelheid van 9

omwentelingen per minuut. Wanneer het zuurstofgehalte beneden 10% was, werden de flessen gedurende 15 minuten geopend.

Het effect van verschillende manieren van bewegen op de groei van schimmels werd onderzocht, met dezelfde verhoudingen van bodem 2 en PDB als hierboven maar met een kleiner eindvolume (Tabel 3.3). De flessen werden deze keer afgesloten met schuimkappen waardoor een goede diffusie van zuurstof mogelijk was. Duplo's werden voorbereid en de groei werd bestudeerd met continue rollen op een roller mixer (SRT9D, Stuart) bij 10 rpm, continu stilstaan, en afwisselend rollen en stil staan (1 uur rollen, 5 uur stilstand).

Tabel 3.2 *Conditioes voor bepalen beste groeiconditioes A. niger en V. leptobactrum met grond.*

Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Nat (40% w/w medium)	X	X	X	X	X	X	X	X								
Droog (20% w/w medium)									X	X	X	X	X	X	X	X
Steriel	X	X	X	X					X	X	X	X				
Non steriel					X	X	X	X					X	X	X	X
Bodem 1	X	X			X	X			X	X			X	X		
Bodem 2			X	X			X	X			X	X			X	X
<i>A. niger</i>	X		X		X		X		X		X		X		X	
<i>V. leptobactrum</i>		X		X		X		X		X		X		X		X
Arm medium (glucose)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Rijk medium (PDB)																

Nr	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Nat (40% w/w medium)	X	X	X	X	X	X	X	X								
Droog (20% w/w medium)									X	X	X	X	X	X	X	X
Steriel	X	X	X	X					X	X	X	X				
Non steriel					X	X	X	X					X	X	X	X
Bodem 1	X	X			X	X			X	X			X	X		
Bodem 2			X	X			X	X			X	X			X	X
<i>A. niger</i>	X		X		X		X		X		X		X		X	
<i>V. leptobactrum</i>		X		X		X		X		X		X		X		X
Arm medium (glucose)																
Rijk medium (PDB)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Voor het bepalen van de beste groeiconditioes voor *A. niger* en *V. leptobactrum* met grond werden 32 combinaties getest bij 20 °C. Dit experiment is uitgevoerd met 250 mL flessen geïncubeerd met klein stukjes Potato Dextrose Broth (PDB) met voorgegroeide schimmels. Aan elke batch was 20 g grond (1 of 2) toegevoegd.

Tabel 3.3 Verhoudingen bij experiment naar effect van verschillende mengregimes bij groei van schimmels in grond.

Nr.	Ent	Bodem	Medium	Aantal flesjes
1 (a and b)	Geen	Bodem 2 (4,2 g)	PDB (2,94 mL)	2
2 (a and b)	<i>A. niger</i> (0,1 mL 48 uur gegroeide schimmel)	Bodem 2 (4,2 g)	PDB (2,84 mL)	2
3 (a and b)	<i>V. leptobactrum</i> (0,1 mL 48 uur gegroeide schimmel)	Bodem 2 (4,2 g)	PDB (2,84 mL)	2

Alle combinaties zijn in duplo uitgevoerd. Elk van deze 6 vials is onderworpen aan 3 verschillende bewegingscondities: continu stilstaan, continu rollen, en afwisselend stilstaan en rollen (go and stop) (1 uur rollen, 5 uur stilstaan).

3.3 Afbraak van asbestcement

3.3.1 Zuurtitratie van asbestcement

Twee opstellingen met automatische zuurtitratie werden gebruikt om de invloed van de zuren en de pH op het asbestcement te analyseren (Figure 3.2). De gebruikte flessen bevatten 10 g asbestcement, 50 ml PDB en een magneetroerder om de oplossing te mengen. In elke fles werden pH-elektroden geplaatst en gekoppeld aan een biocontroller (ADI 1010, Applikon). Wanneer de gemeten pH meer dan 7 was, werden de peristaltische pompen (Easy-load L/S, Masterflex) gekoppeld aan zuuroplossingen geactiveerd om een beetje zuuroplossing toe te voegen tot de pH onder 7 daalde. Voor één opstelling werd 1 M HCl als zuuroplossing gebruikt, voor de andere werd 1 M citroenzuur en oxaalzuuroplossing gebruikt.



Figure 3.2 Titratie opstelling voor het bepalen van de hoeveelheid zuur die nodig was om het asbestcement af te breken. Links: HCl; rechts: citroenzuur/oxaalzuur.

3.3.2 Asbestcement in kolommen

Kleinschalige opstellingen werden gemaakt met 0,4 L plastic kolommen (Figuur 3.3). Elke kolom werd aan een plastic 250 ml fles gekoppeld met slangen (Figuur 3.4). De flessen

werden afgesloten met plastic septa en werden aan de top van de kolommen gekoppeld met een peristaltische pomp (505S, Watson Marlow) waardoor de oplossing in plastic buizen stroomde met een snelheid van 7,5 ml/min. Verschillende maten asbestcementstukken werden in elke kolom (<1 mm, 1-8 mm en 8-16 mm) gebruikt. Om de asbestcement in de kolommen te houden, werd een maas met een dikte van 1,5 cm aan de onderkant van elke kolom aangebracht. Eén kolom werd geïnoculeerd met 135 ml MES (11 mM) en 15 ml oxaalzuur (0,2 M). De andere kolommen werden geïnoculeerd met 150 ml PDB en 1 ml medium met 106 sporen van *A. niger*, *V. leptobactrum* of een deel van het onbekende schimmel (Tabel 3.4).

Vloeistof werd elke 2-3 weken bemonsterd. De gashoeveelheden in de flessen van elke kolom werden gemeten zodra de groei in de flessen zichtbaar was. Wanneer de O₂-hoeveelheden in sommige flessen lager was dan 10%, werden alle flessen een dag lang geopend, zodat er weer voldoende zuurstof binnen kon komen. Na 2 maanden werd, om O₂ uitputting te voorkomen, de kap van elke kolom open gehouden, maar verpakt in aluminiumfolie.

Bij de kolommen waarin groei was, werd DNA geëxtraheerd met de DNeasy PowerLyzer PowerSoil kit (Qiagen) van 0,5 ml niet-gefilterd monster.

Om het effect van zuur op het asbestcement te bestuderen werd 5 ml citroenzuur en oxaalzuur van 1 M toegevoegd aan de kolom die MES bevatte. De pH werd regelmatig gemeten, en zodra de pH meer dan 8,5 was, werd 5 ml van de zure oplossing toegevoegd aan de kolom.

Tabel 3.4 Samenstelling van de trickling filters met asbestcement

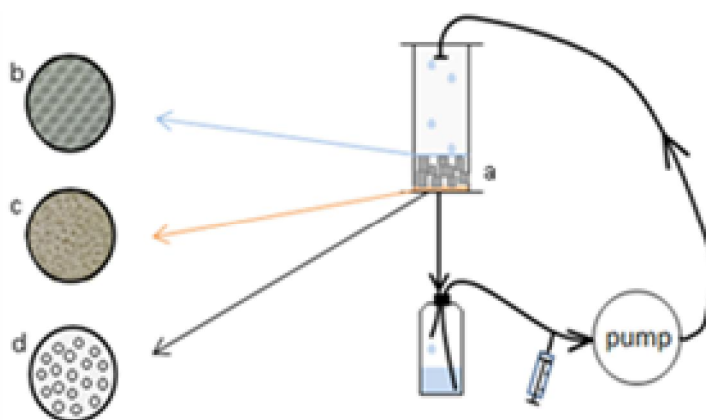
Kolom nr.	Ent	Grootte asbest cement	Gewicht asbest cement	Medium	Volume medium	Volume ent
1	<i>A. niger</i> (sporen)	8-16 mm	26,48 g	PDB	150 mL	1 mL
2	<i>V. leptobactrum</i> (sporen)	8-16 mm	26,47 g	PDB	150 mL	1 mL
3	<i>A. niger</i> (sporen)	1-8 mm	25 g	PDB	150 mL	1 mL
4	Oxaalzuur	1-8 mm	25,05 g	MES	135 mL	15 mL
5	Natuurlijke schimmels	1-8 mm	24,95 g	PDB	150 mL	1 mL
6	<i>A. niger</i> (sporen)	<1 mm	8,96 g	PDB	150 mL	1 mL
7	<i>V. leptobactrum</i> (sporen)	<1 mm	8,19 g	PDB	150 mL	1 mL

De kolomopstelling is gebruikt voor 7 kolommen met asbestcement van verschillende groottes, geïnoculeerd met verschillende schimmelsoorten of zuren. Bij oxaalzuur als toevoeging is de buffer MES als medium gebruikt. MES buffer heeft een pKa van 6.15 bij 20 °C. Voor de kolommen waarbij schimmelsporen als ent gebruikt zijn, is 1 mL ent met 106 sporen gebruikt.



Figuur 3.3 Trickling filters van verschillende schaal.

A: grootschalig trickling filter; B: kleinschalige lab trickling filters. De achtergrond van dit experiment was het reproduceren van een trickling filter op kleine schaal om the effectiviteit van dit proces voor de afbraak van asbest door schimmels te analyseren. De doorstroomsnelheid was 7.5 mL/min.



Figuur 3.4 Schematische weergave van trickling filter modelsysteem voor de asbest-cement experimenten.

De asbestcement stukken (a) waren 8-16 mm, 1-8 mm of < 1 mm. Bovenop de asbestcement stukken bevond zich een maas (b) om de druppels te verdelen. Onder de asbestcement stukken bevond zich eerst een fijn schuim van 1,5 cm (c) en daaronder een plastic met verschillende kleine gaten (d) om de vloeistof door te laten, en de asbestcement niet.

3.3.3 Asbestcement in baffled bottles

Om de groei van schimmels in contact met asbestcement te analyseren, werden acht 250 ml *baffled bottles* bereid met 10 g asbestcementstukken van 1-8 mm. Twee flessen werden geënt met 106 sporen van *A. niger* in 50 ml PDB of glucose medium. Twee andere flessen werden op dezelfde manieren geënt, maar met *V. leptobactrum*. In een andere fles werden 45 ml MES (11 mM) en 5 ml oxaalzuur (0,2 M) toegevoegd. De drie laatste flessen werden geïnoculeerd met 50 ml PDB en 1 ml groeiende *A. creber* (Onbekende schimmel 1), groeiende onbekende schimmel (onbekend schimmel 2) of PDB. In Tabel 3.5 is een overzicht gegeven van de omstandigheden in alle flessen.

De baffled bottles werden bij 10 rpm op de roller mixer geplaatst. De flessen werden regelmatig bemonsterd om de oplossing te analyseren. In twee flessen, waar geen schimmels groeiden, werden kleine hoeveelheden 1 M HCl of 1 M oxaalzuur en citroenzuur toegevoegd. Zo kon het effect van de zuren en het asbestcement op de pH worden bestudeerd. Telkens wanneer de pH hoger was dan 9, werd 0,2 ml HCl (1 M) of oxaalzuur en citroenzuur (1 M) aan de flessen toegevoegd.

Tabel 3.5 Samenstelling van de baffled bottles.

Fles nr	Inhoud	Grootte cement asbest	Medium	Hoeveelheid medium (ml)	Hoeveelheid cement (g)
1	<i>Aspergillus niger</i> (sporen) (1 ml)	1-8 mm	PDB	50	10,8
2	<i>Aspergillus niger</i> (sporen) (1 ml)	1-8 mm	Glucose	50	10,17
3	<i>V. leptobactrum</i> (sporen) (1 ml)	1-8 mm	PDB	50	10,13
4	<i>V. leptobactrum</i> (sporen) (1 ml)	1-8 mm	Glucose	50	10,24
5	Oxaalzuur (5 ml)	1-8 mm	MES (11 mM)	45	10,08
6	Onbekende schimmel 1 (1 ml)	1-8 mm	PDB	50	10,35
7	Onbekende schimmel 2 (1 ml)	1-8 mm	PDB	50	10,15
8	Blanco	1-8 mm	PDB	50	10,05





Figuur 3.5 Cement mixers van verschillende schaal.

A: cement mixer truck; B: kleinschalige model cement mixers. Om een cement mixer te modelleren, zijn baffled bottles gebruikt met 10 g asbest cement stukken die zijn geënt met PDB en schimmels of oxaalzuur. Het effect van beweging op schimmelgroei en afbraak van het asbestcement is bestudeerd. De rolsnelheid was 10 rpm.

3.3.4 Asbestcement in rollende flesjes

Als voorbereiding voor de pilotstudie zijn kleine hoeveelheden asbestcement op vier manieren geïncubeerd:

- Met water
- Met een mengsel van oxaalzuur en citroenzuur
- Met *Aspergillus niger*
- Met *Verticillium leptobactrum*.

De aanpak was als volgt.

Een hoeveelheid van 4,2 g asbestcement van ca 5 mm is afgewogen. Aan elk flesje is 0,8 ml 1M citroenzuur toegevoegd. Vervolgens is het flesje gedurende vier uur bij 10 RPM gerold totdat alle citroenzuur was neergeslagen. Daarna is 0,6 ml 1M citroenzuur toegevoegd en 1 uur gerold. Vervolgens zijn de flesjes geïncubeerd met de volgende mengsels.

Tabel 3.6 Samenstelling van de trickling filters met asbestcement

	Vial number	Inoculum	Medium	Asbest cement	Aantal flesjes
A (Asbestos-cement)	1 (a, b, c and d)	Ø	water (2,94 mL)	4,2 g	4
	2 (a, b, c and d)	acid mix (oxalic and citric acid 1 M) (1 mL)	MES (1,94 mL)	4,2 g	4
	3 (a, b, c and d)	<i>A. niger</i> (0,1 mL of grown fungus)	PDB (2,84 mL)	4,2 g	4
	4 (a, b, c and d)	<i>V. lepto</i> (0,1 mL of grown fungus)	PDB (2,84 mL)	4,2 g	4

Op verschillende tijdstippen is een monster van de vloeistof genomen en is de concentratie oxaalzuur, citroenzuur, Ca, Mg, Fe, en de pH bepaald.

3.4 Afbraak van chrysotiel in grond

De groei en activiteit van schimmels in contact met chrysotiel besmette grond werd onderzocht in kleine injectieflesjes van 20 ml, afgesloten met schuimkapjes. In elk flesje werd 0,1 g chrysotielvezels, 4,2 g bodem 2 en een eindvolume na inoculatie van 2,94 ml medium (PDB, MES of water) gebracht (Tabel 3.7). Voordat elk flesje met schimmels werd geënt, waren de schimmels in de juiste hoeveelheid PDB 48 uur voor de inenting gegroeid. Vervolgens werden ze op de roller mixer bij 10 omwentelingen per minuut gehangen onder een hoek van 82°. De inhoud van de injectieflesjes is over de tijd bestudeerd.

Door verdamping nam het volume in de flesjes gedurende de tijd af. Daarom is regelmatig medium toegevoegd. Op 16 juni 2017 is het experiment gestart. Er is medium toegevoegd op 27 juni, 20 juni, 7 juli, 14 juli, 21 juli, 28 juli, 4 augustus, 10 augustus, 17 augustus, 23 augustus, 7 september, 20 september, 4 oktober, 11 oktober, 24 oktober, en 9 november.

Tabel 3.7 Schimmelgroei in aanwezigheid van grond en puur chrysotiel.

Flesje	Ent	Bodem	Chrysotiel	Medium	Aantal flesjes
1 (a, b, c, d)	Geen	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	water (2,94 mL)	4
2 (a, b, c, d)	Geen	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	PDB (2,94 mL)	4
3 (a, b, c, d)	Oxaal- en citroenzuur (1 mL 1M)	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	MES (1,94 mL)	4
4 (a, b, c, d)	<i>A. niger</i> (0,1 mL)	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	PDB (2,84 mL)	4
5 (a, b, c, d)	<i>A. niger</i> (0,5 mL)	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	PDB (2,44 mL)	4
6 (a, b, c, d)	<i>V. leptobactrum</i> (0,1 mL)	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	PDB (2,84 mL)	4
7 (a, b, c, d)	<i>V. leptobactrum</i> (0,5 mL)	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	PDB (2,44 mL)	4
8 (a, b, c, d)	<i>A. niger</i> + <i>V. leptobactrum</i> (0,1 mL elk)	Bodem 2 (4.2 g)	0,1 g	PDB (2,74 mL)	4

20 mL flesjes zijn met gevuld zoals ingegeven in de tabel, en op een rollermixer gezet bij een snelheid van 10 rpm. De flesjes waren afgesloten met schuimcaps, zodat zuurstof bij de oplossing kon komen. Elke conditie in de tabel is in viervoud uitgevoerd, zodat elk van de vier flesjes op een ander tijdstip opgeofferd en gemeten kon worden. Flesjes "a" komen overeen met T0, "b" met T1, "c" met T2 en "d" met T3.

3.5 Analyse van door schimmels geproduceerde stoffen

3.5.1 Sideroforen

Om de sideroforen concentratie te meten werd een CAS-assayoplossing bereid volgens Schwyn en Neilands (1987), maar de piperazine werd vervangen door PIPES en de pH werd op 6.1 gebufferd met 1M NaOH. EDTA was als standaard gebruikt vanwege de ijzer-chelerende werking van deze stof. De gebruikte standaardconcentraties waren van 10 g/L tot 10⁻⁴ g/L EDTA, waarbij voor de verdunningen water of PDB werd gebruikt. De ijzer-chelerende werking werd gemeten door spectrofotometrie (Xion500, DR Lange) bij 630 nm en 480 nm, na stabilisatie van de kleur, door 0,5 ml monster met 0,5 ml CAS-assayoplossing te mengen.

Ter bevestiging van de ijzer-chelerende activiteit van het PDB in vergelijking met water, werd een precipitatie-experiment uitgevoerd met behulp van FeCl₃. 1 g/L FeCl₃ werd opgelost in 10

ml water of PDB en 0,18 ml 1 M NaOH werd toegevoegd. De pH werd gemeten met pH papier.

3.5.2 Gasmeting

CO₂-, N₂- en O₂-metingen werden uitgevoerd door gaschromatografie (GC) (CP-3800, Varian) met 0,1 ml van het gas dat moest worden geanalyseerd. De gebruikte kolom is een Tandem Varian CP7430 Porabond Q, het draaggas is helium met 40 ml/min.

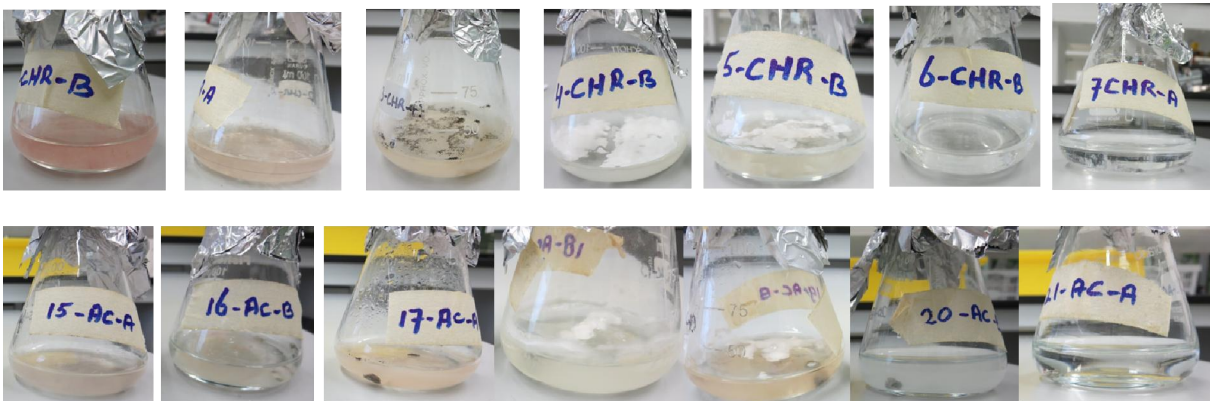
3.5.3 Zuren, magnesium en calcium

Voorraadoplossingen van oxalaat 1000 mg/L en citraat 1000 mg/L werden bereid met oxaalzuurdihydraat (Merck) en tri-natriumcitraatdihydraat (Merck). Om oxalaat te verkrijgen uit de oxaalzuuroplossing werd NaOH 1 M toegevoegd om pH 10,2 te bereiken. Voor elke vloeistofbemonstering werd 7 ml oplossing bemonsterd. 1 ml niet gefilterde oplossing werd bewaard bij -80 °C. 0,5 ml oplossing werd over een 0,45 µm filters gefilterd om de pH te meten. De rest werd bij 4 °C opgeslagen om de organische zurenconcentratie te meten met Dionex ion chromatografie (IC) (Dionex ICS-3000, anion kolom). De IC-resultaten werden vergeleken met de standaard curves die van 0,1 mg/L tot 100 mg/L werden uitgevoerd met de oxalaat- en citraat stockoplossingen. Na elke bemonstering werd dezelfde hoeveelheid vers medium toegevoegd aan de bemonsterde oplossing om de volumes constant te houden.

4 Resultaten

4.1 Voorstudie: screening asbestafbraak met schimmels

De schimmelcultures groeiden goed (zie bijlage A, en Figuur 4.1).

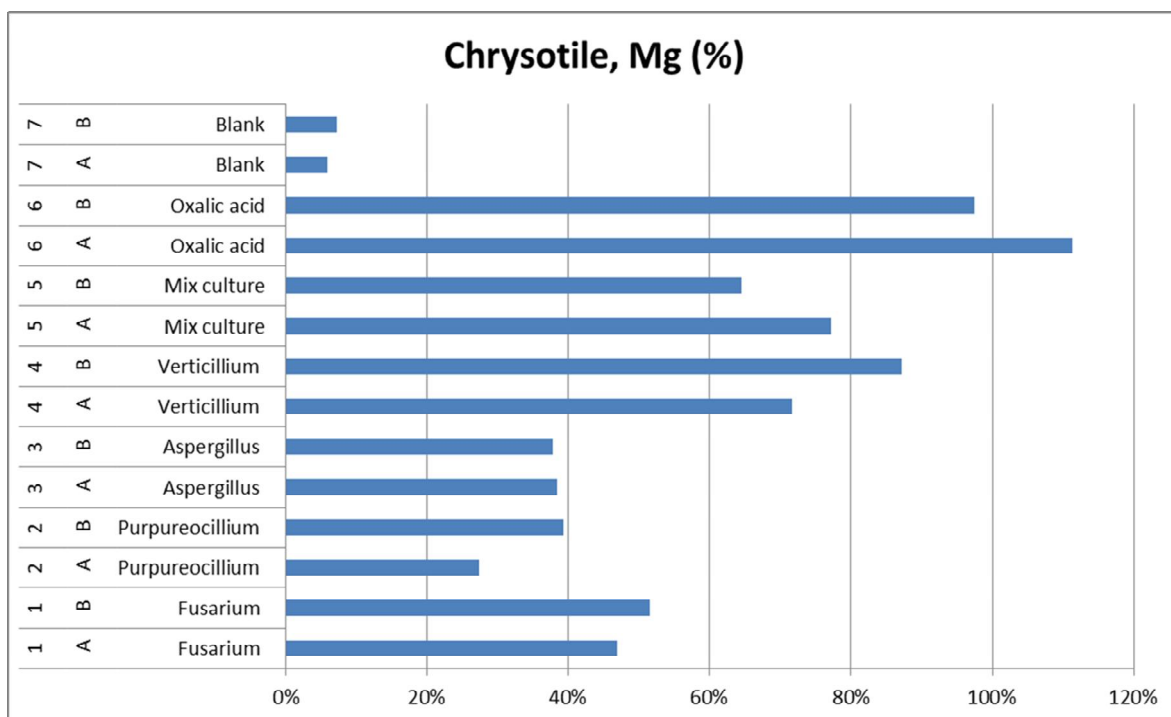


Figuur 4.1 Illustratie van groei van schimmelcultures aan de hand van cultures met chrysotiel (boven) en asbestcement (onder). De foto's geven de toestand na 1 maand groei weer.

Om het oplossen van het asbest te volgen is op verschillende tijdstippen de concentratie van de ionen Mg, Fe, Al, en Ca in de oplossing bepaald. Bij het oplossen van het asbest komen deze ionen vrij, en de concentratie van deze ionen in de oplossing kan dus worden omgerekend naar de hoeveelheid asbest die minimaal opgelost kan zijn.

Voor deze analyses zijn op een aantal tijdstippen vloeistofmonsters genomen, gefiltreerd over een 0,2 µm filter, en door middel van ICP-MS geanalyseerd op de ionen Mg, Fe, Al, Ca. Er is ook nagegaan of Si kon worden bepaald, maar de achtergrondwaarde hiervan lag te hoog (waarschijnlijk door Si die vrijkomt uit de glazen erlenmeijers).

De gevonden concentraties zijn omgerekend naar % ten opzichte van ionen aanwezig in asbestmonsters.



Figuur 4.2 Opgelost Mg na 1 maand blootstelling (24 dec 2015) ten opzichte van Mg in asbestmonsters.

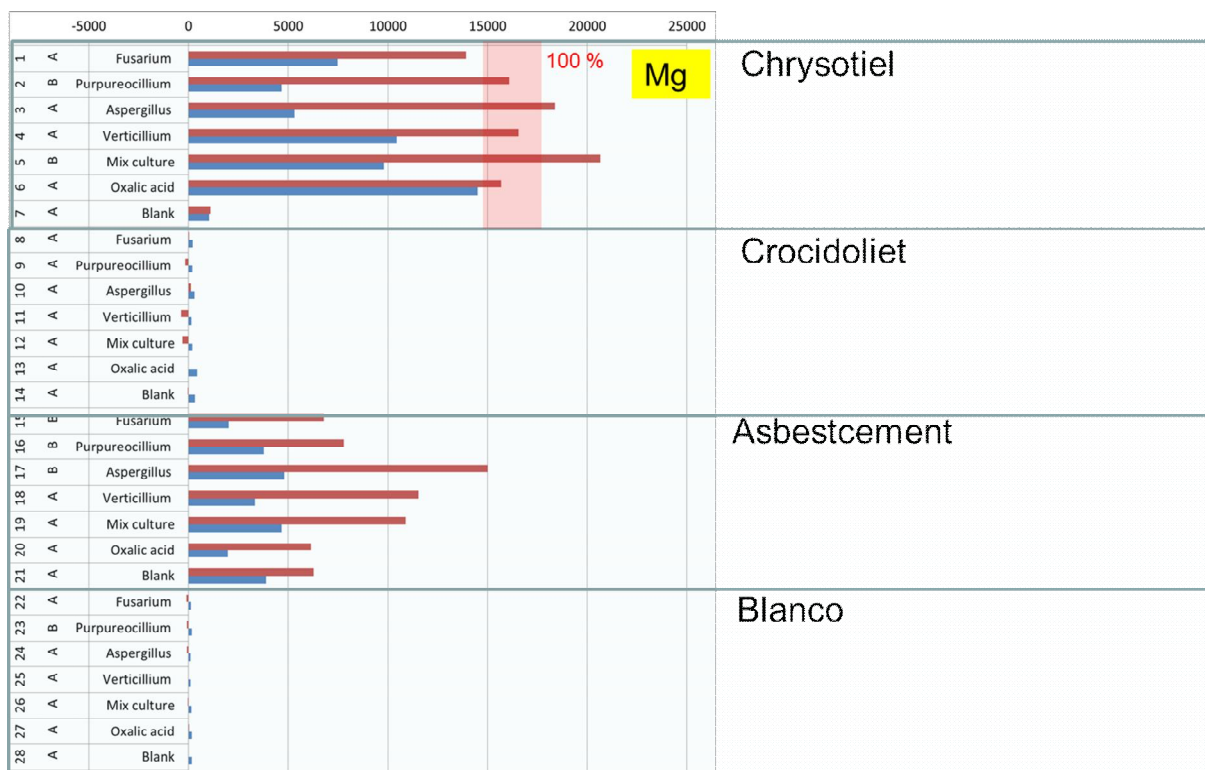


Figure 4.3 Magnesium (Mg) in oplossing gemeten na 1 maand blootstelling (blauw) en 11 maanden blootstelling (rood).

Figure 4.3 laat zien hoeveel magnesium er in de vloeistof gemeten is na 1 maand en na 11 maanden blootstelling. De monsters met Chrysotiel (1 t/m 7) laten in alle gevallen 100% verwijdering zien. De blanco met chrysotiel maar zonder schimmels of oxaalzuur laat geen

significante oplossing van chrysotiel zien. Crocidoliet (8 t/m 14) bevat geen magnesium, en hier is dan ook geen toename van de Mg concentratie te zien. Asbestcement (15 t/m 21) laat na een toename van Mg in de eerste maand een verdere toename in overige periode van de 11 maanden zien. Deze stijging is minder hoog dan bij chrysotiel. Het is onbekend of de magnesium die hierbij gemeten wordt afkomstig is uit het asbest of uit het cement. De blanco monsters zonder asbest (22 t/m 28) laten alle geen significante toename van de Mg concentratie zien.

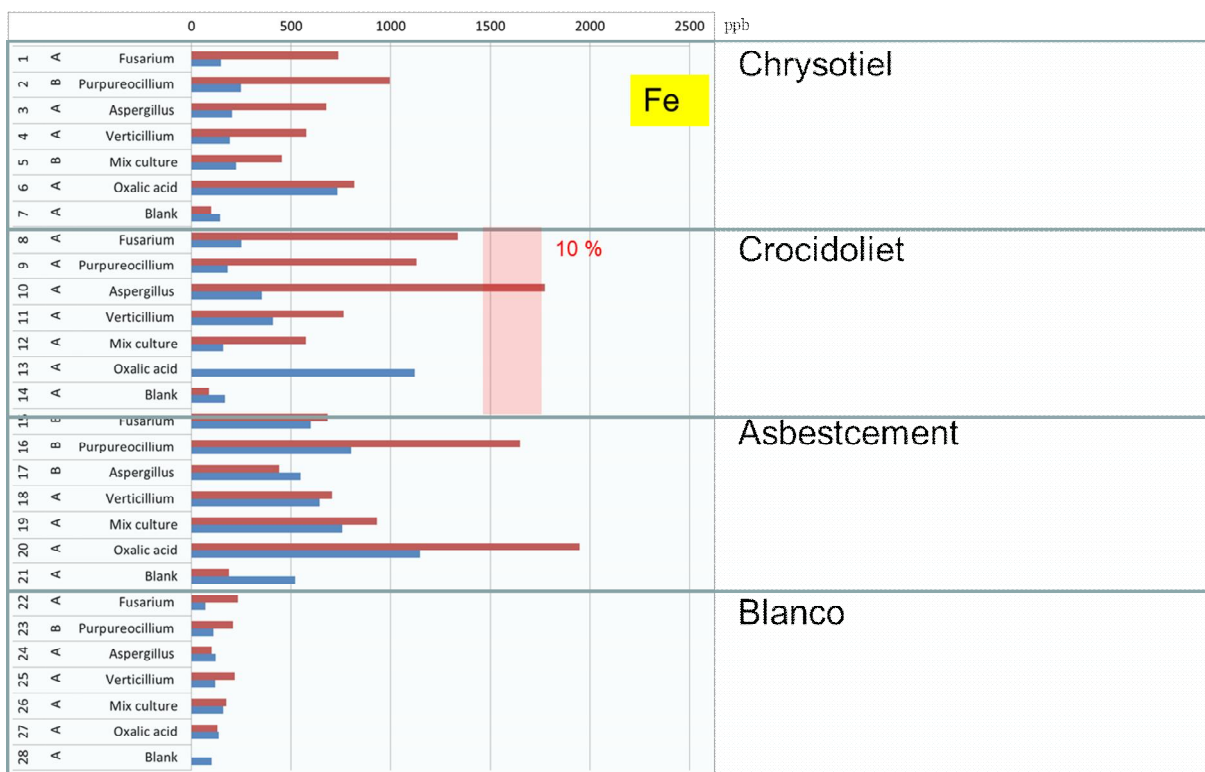
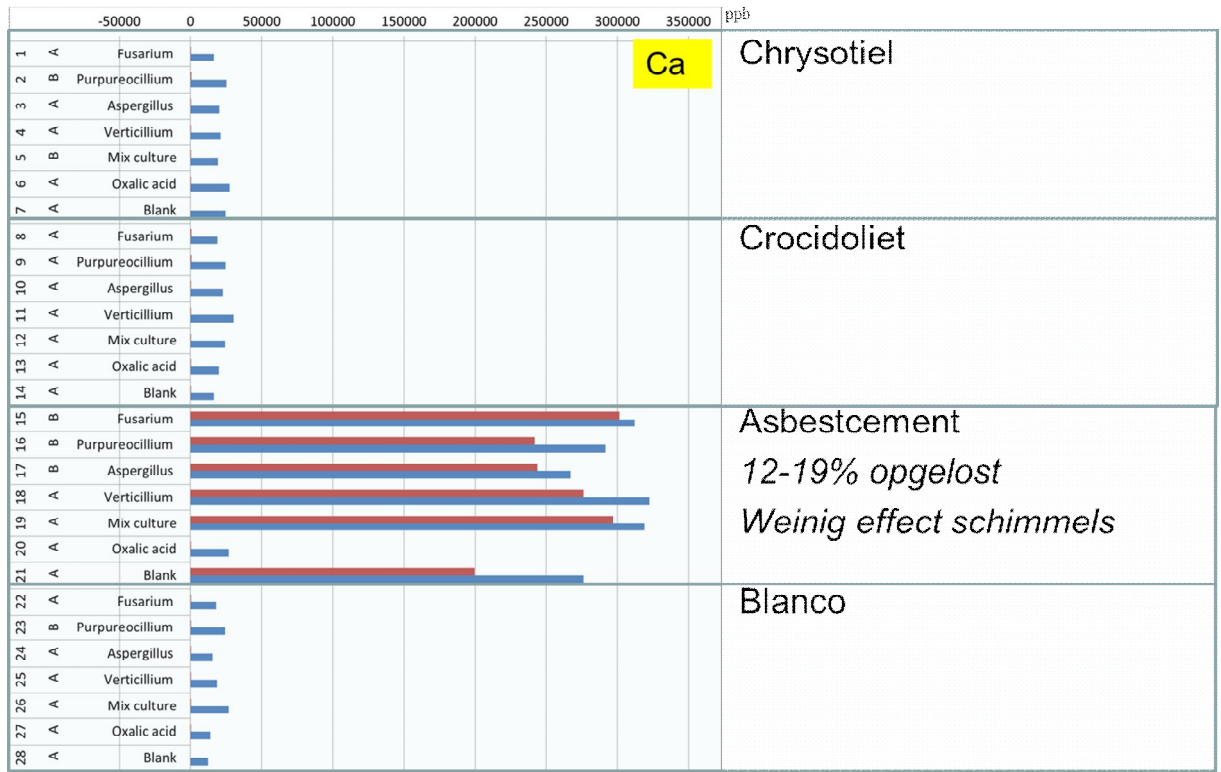


Figure 4.4 IJzer (Fe) in oplossing gemeten na 1 maand blootstelling (blauw) en 11 maanden blootstelling (rood).

Figure 4.4 laat zien hoeveel Magnesium er in de vloeistof gemeten is na 1 maand en na 11 maanden blootstelling. De monsters met Chrysotiel (1 t/m 7) laten in alle gevallen een significantie toename zien. De blanco met chrysotiel maar zonder schimmels of oxaalzuur laat geen significante oplossing van chrysotiel zien. Crocidoliet (8 t/m 14) laat een toename van Fe zien, vooral voor *Fusarium* en *Aspergillus* (5-10%). Asbestcement (15 t/m 21) laat een toename van Fe in de eerste maand zien, en daarna vooral voor *Purpureocillium* en oxaalzuur een verdere toename. Het is onbekend of de Fe die hierbij gemeten wordt afkomstig is uit het asbest of uit het cement. De blanco monsters zonder asbest (22 t/m 28) laten alle geen significante toename van de Fe concentratie zien.



Figuur 4.5 Calcium (Ca) in oplossing gemeten na 1 maand blootstelling (blauw) en 11 maanden blootstelling (rood).

De belangrijkste resultaten van dit onderzoek zijn:

- Alle schimmelcultures zijn goed gegroeid.
- Chrysotiel:
Aanzienlijke verwijdering in 1 maand:
 - Schimmels: 30 – 85 %
 - Oxaalzuur: 95-100 %
- Crocidoliet:
Er is een meetbaar effect zichtbaar op ijzer (Fe), maar dit is klein.
- Asbestcement:
Geen duidelijke effecten zichtbaar.

Opvallend is, dat chrysotiel sterker opgelost wordt dan gerapporteerd in de literatuur. Een mogelijke reden hiervoor is het gebruik van selectief medium die de schimmels aanzet tot extra sterk oplossen van asbest.

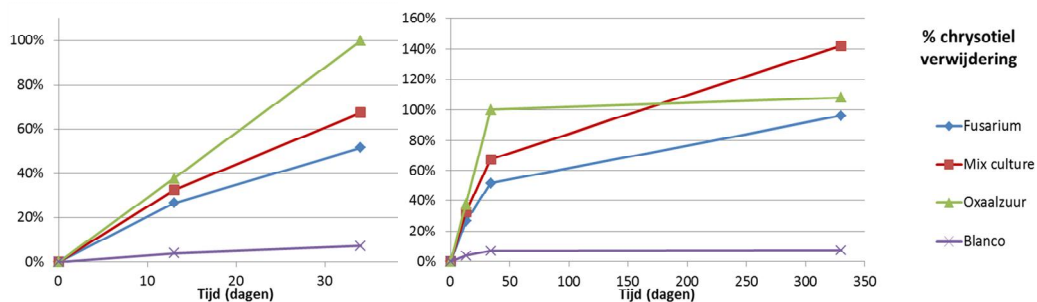


Figure 4.6 Tijdverloop van verwijdering van chrysotiel (%) berekend aan de hand van % Mg opgelost bij selectie van asbestbehandelingen.

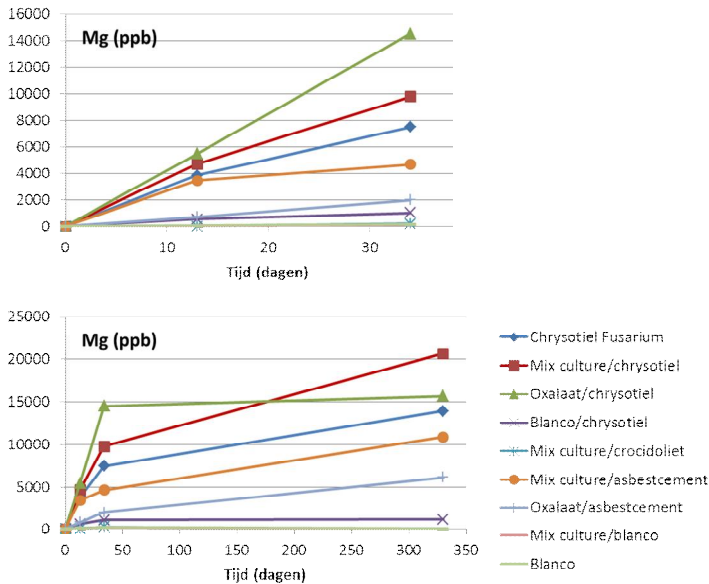


Figure 4.7 Tijdverloop van Mg in oplossing bij selectie van asbestbehandelingen.

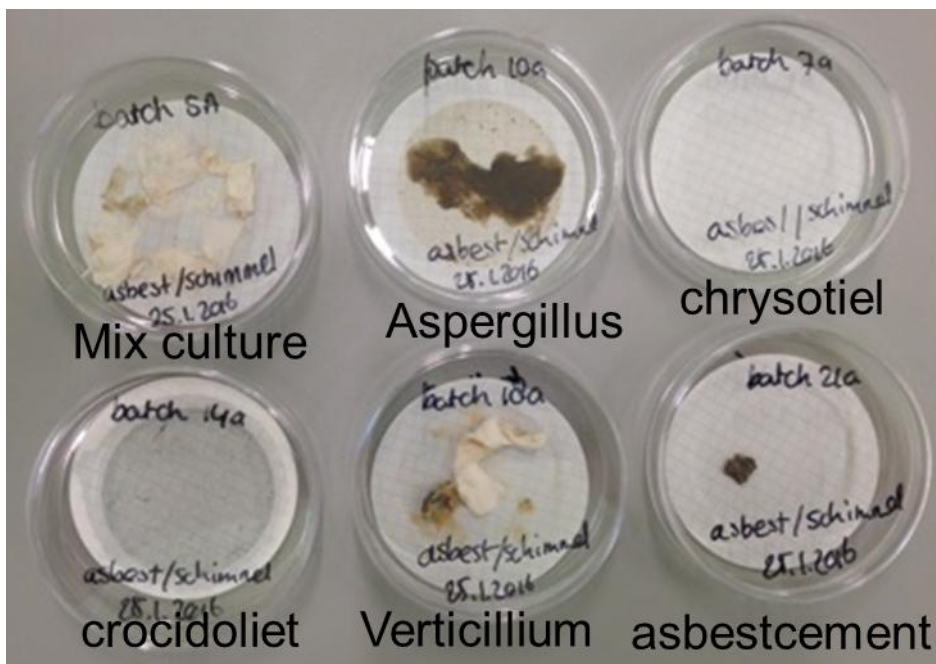
Samengevat komen deze resultaten neer op het volgende:

- Chrysotiel: 100 % opgelost bij alle schimmels en oxalaat;
- Crocidoliet: er lijkt ca. 5-10 % opgelost;
- Asbestcement lost op, nog onduidelijk hoeveel % cement en hoeveel % asbest.

In Tabel 4.1 zijn de door TNO geanalyseerde monsters samengevat. In de tabel zijn ook de bij deze monsters waargenomen opgeloste concentraties van Mg en Fe weergegeven.

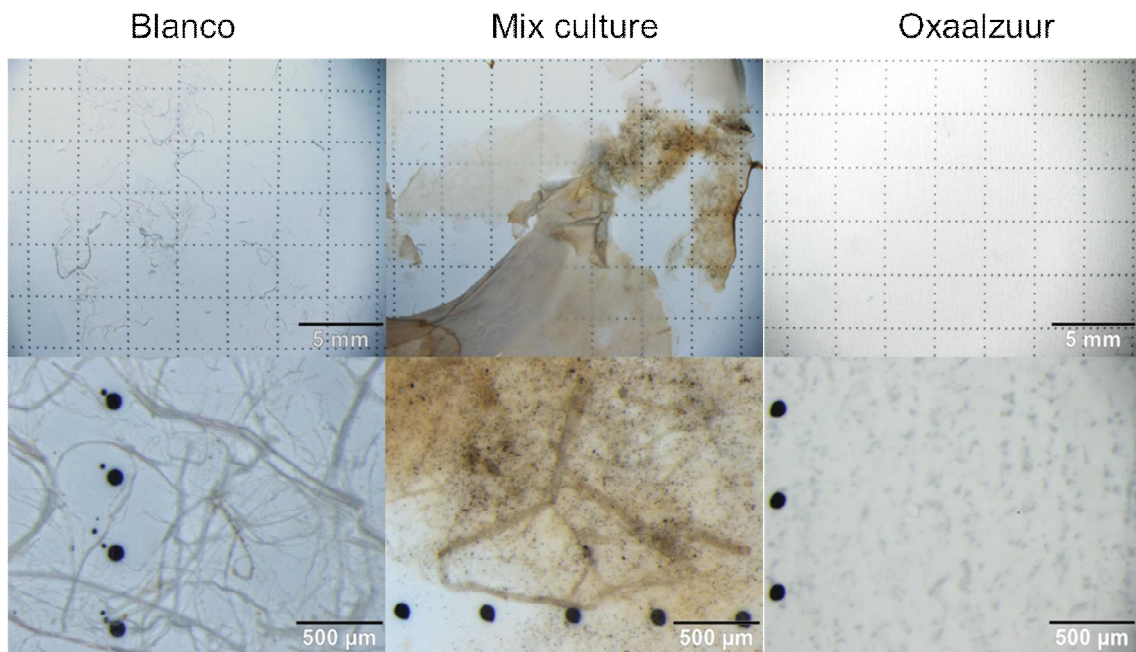
Tabel 4.1 Door TNO geanalyseerde monsters.

Type asbest	Blanco	Behandeling	% afbraak (ICP-MS)	
			Mg	Fe
Chrysotiel	7A	5A – mix culture	71% (±9%)	-
		6A – oxaalzuur	104% (±10%)	-
Crocidoliet	14A	10A – <i>Aspergillus</i>		0,06% (±0,05%)
		13A – oxaalzuur		0,2% (±0,1%)
Asbestcement	21A	18A – <i>Verticillium</i>	2% (±1%)	

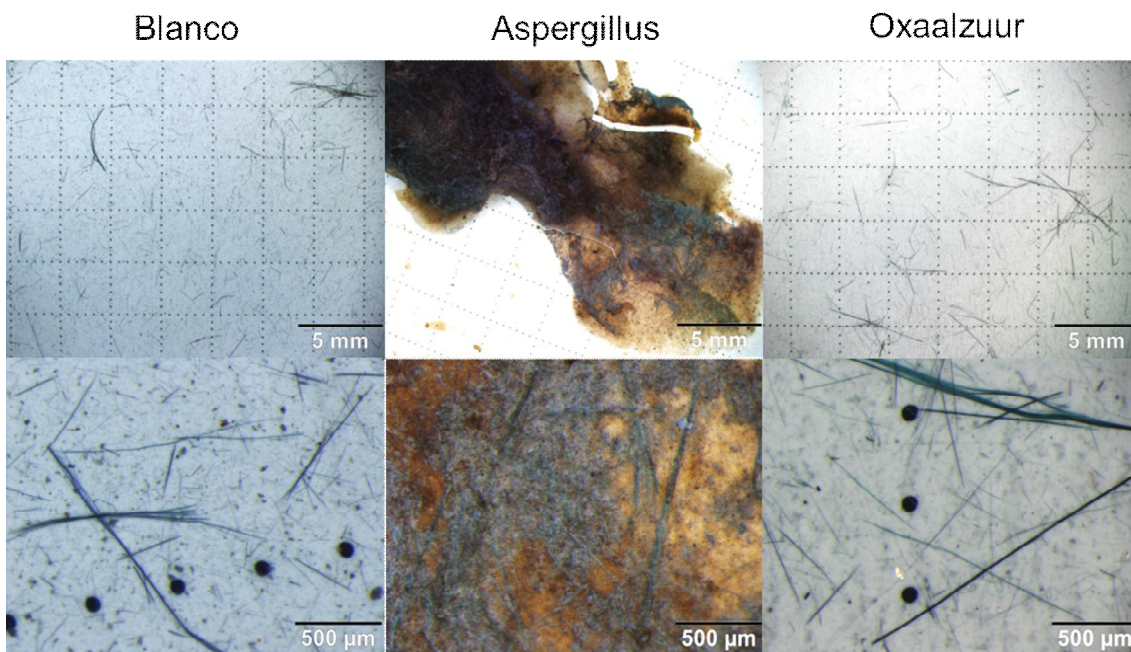


Figuur 4.8 Filters met gefiltreerd materiaal uit schimmelcultures.

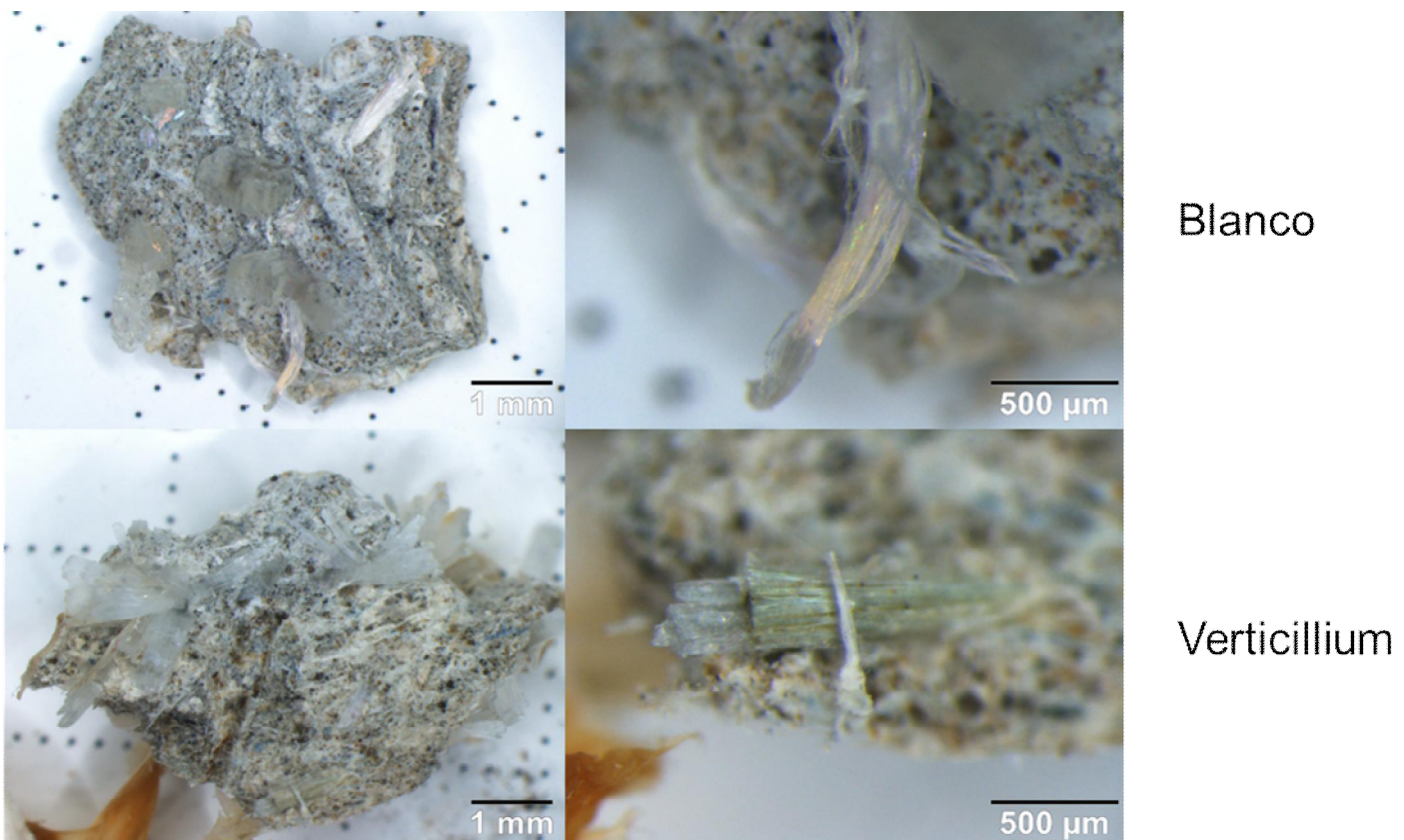
Lichtmicroscopie



Figuur 4.9 Impressie met lichtmicroscopie van de chrysotiel incubaties Blanco (geen schimmels of oxaalzuur), Mix culture (mix van de vier toegepaste schimmels) en Oxaalzuur (geen schimmels, wel oxaalzuur).



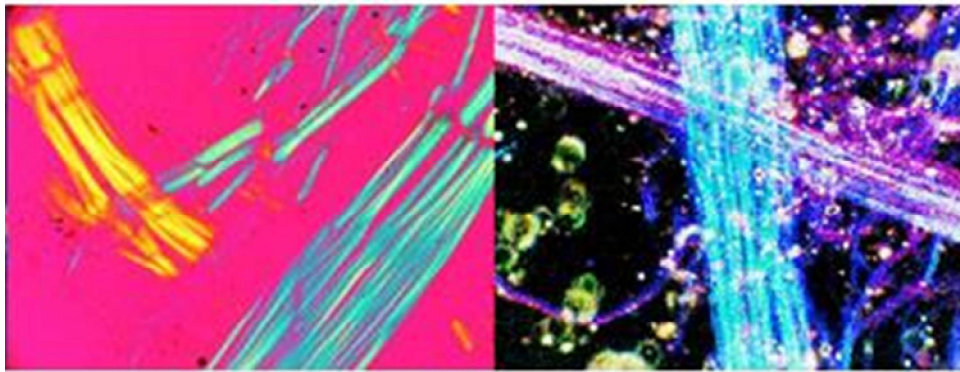
Figuur 4.10 Impressie met lichtmicroscopie van de crocidoliet incubaties Blanco (geen schimmels of oxaalzuur), Aspergillus en Oxaalzuur (geen schimmels, wel oxaalzuur).



Figuur 4.11 Impressie met lichtmicroscopie van de asbestcement Blanco (geen schimmels of oxaalzuur) en Verticillium.

Gepolariseerd Licht Microscopie (PLM)

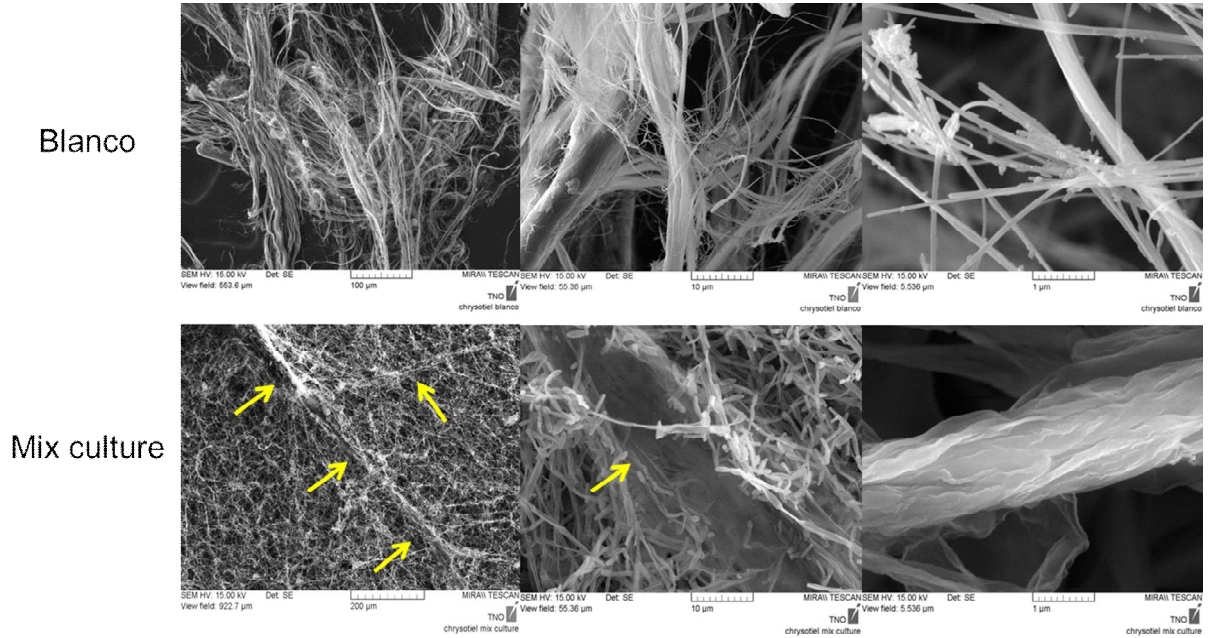
Alle onderzochte vezels in de schimmel/oxaalzuur suspensies zijn kristallijn van vorm. Er zijn geen amorphe vezelstructuren aangetroffen.



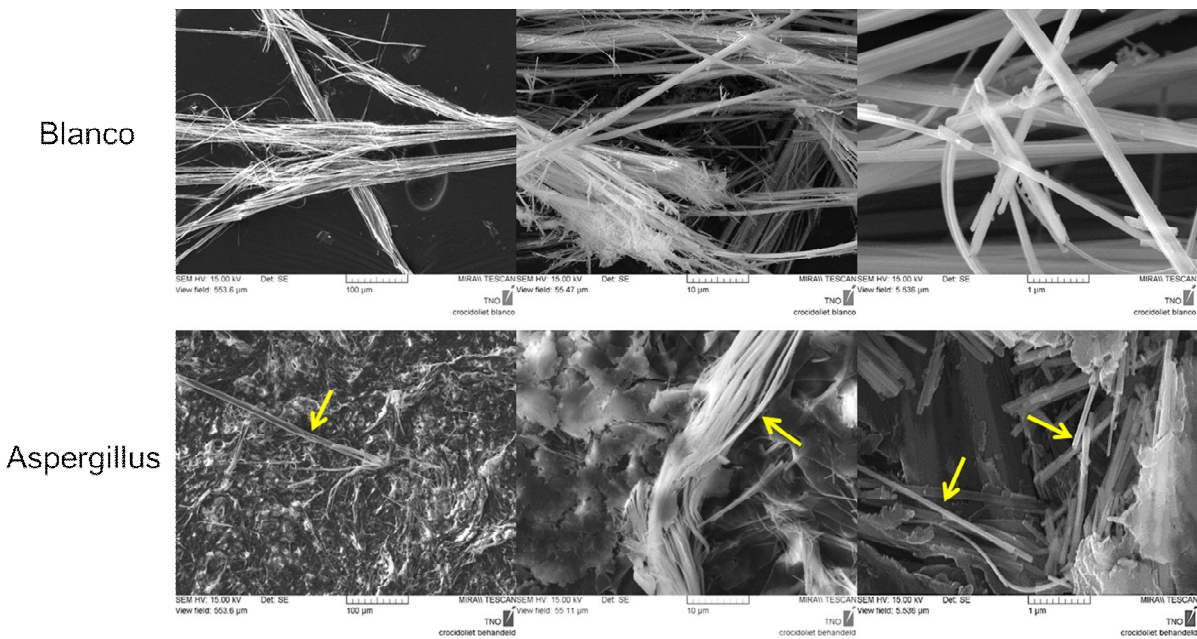
Gepolariseerd licht McCrone objectief

Figuur 4.12 Voorbeeld van PLM beelden van asbestsample.

SEM

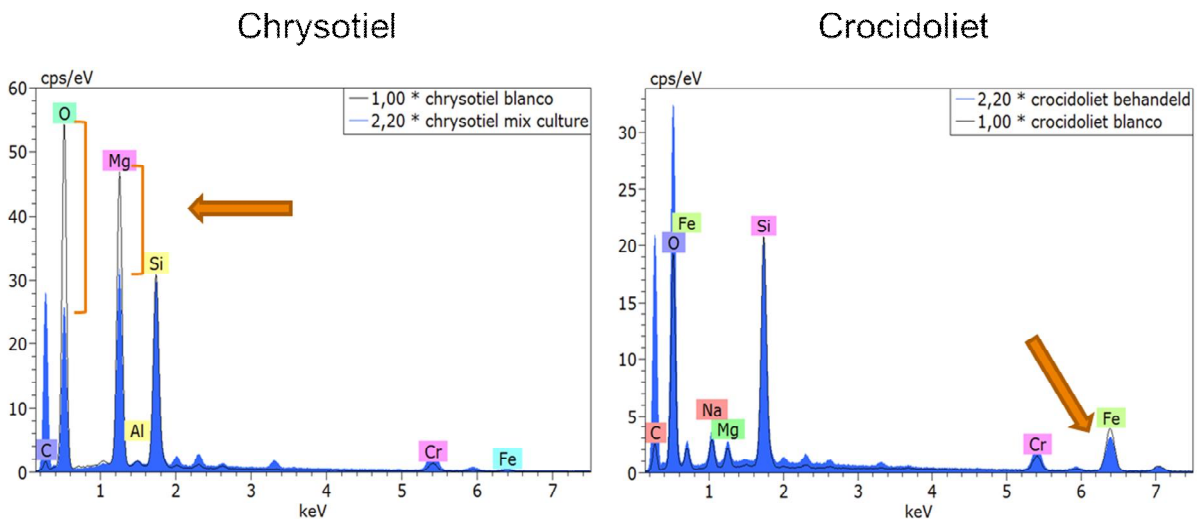


Figuur 4.13 Beoordeling met SEM – chrysotiel.



Figuur 4.14 Beoordeling met SEM – crocidoliet.

Figuur 4.13 en Figuur 4.14 laten zien dat na een maand nog steeds vezels van chrysotiel en crocidoliet zichtbaar aanwezig zijn.



Figuur 4.15 EDX spectra voor/na schimmelbehandeling.

Figuur 4.15 laat de EDX spectra van monsters met chrysotiel en crocidoliet zien. Daarbij is in de figuur zowel een blanco monster (ongekleurd) en een monster blootgesteld aan schimmels (blauw) afgebeeld. Bij chrysotiel is duidelijk te zien dat de elementen Mg en O met ca. de helft zijn afgenomen. Dit is in overeenstemming met de metingen van opgelost Mg (Figure 4.7), en met de interpretatie dat het chrysotiel in deze monsters oplost.

Bij crocidoliet is er alleen een kleine afname in Fe waarneembaar, overeenstemmend met de metingen van opgelost Fe (Figure 4.4), en de interpretatie dat het crocidoliet voor een klein deel oplost.

Het EDX signaal kan gebruikt worden om een indruk van de locatie van de afbraak te krijgen (zie Figuur 4.18). Hierbij wordt gebruik gemaakt van het feit dat bij toenemende energie (kV),

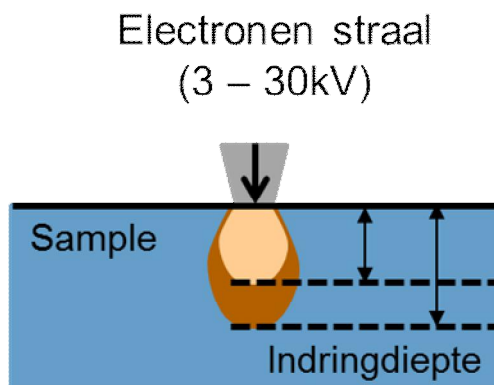
de electronen straal van de EDX dieper in de vezelstructuur door kan dringen. Dit betekent dat het signaal bij lage energie (lage kV) vooral informatie geeft over de oppervlakkige lagen, en bij hogere energie (hogere kV) ook informatie geeft over de diepere lagen. Dit is relevant voor afbraak van chrysotielvezels, omdat deze bestaan uit om elkaar heen gewikkelde lagen (zie Figuur 4.17). Bij afbraak door schimmels verwachten we dat van buiten naar binnen steeds minder afbraak te zien zal zijn.

De mate waarin dit in het EDX signaal tot uiting komt kan beredeneerd worden aan de hand van de reactievergelijking van de afbraak van chrysotiel:

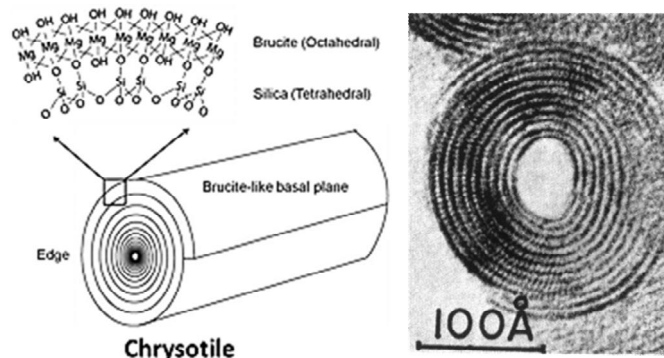


We zien aan deze vergelijking dat we in de de verhoudingen Mg/Si en O/Si veranderen bij het oplossen van chrysotiel.

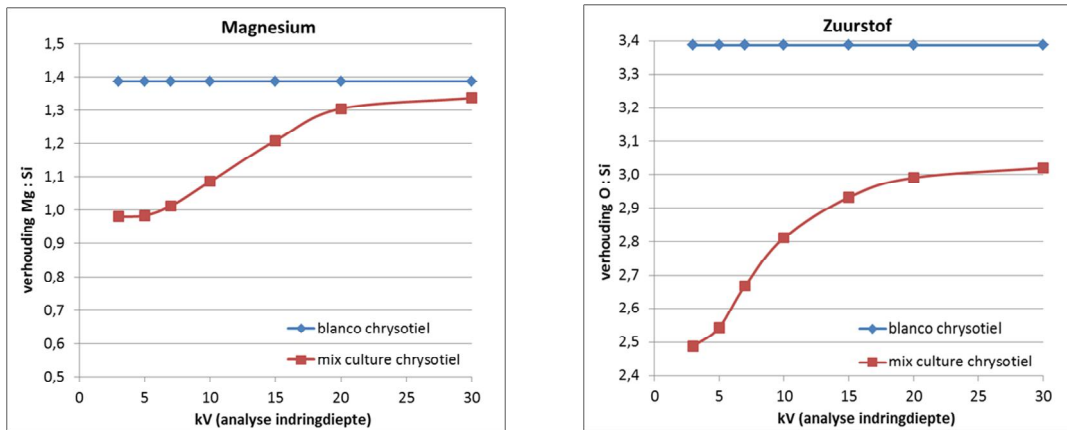
In Figuur 4.18 is te zien dat aan het oppervlak van aan schimmels blootgesteld chrysotiel de verhouding Mg/Si en de verhouding O/Si inderdaad lager is. Verder is in Figuur 4.19 te zien dat de gemeten verhouding Mg/Si dicht bij de theoretische verhouding ligt.



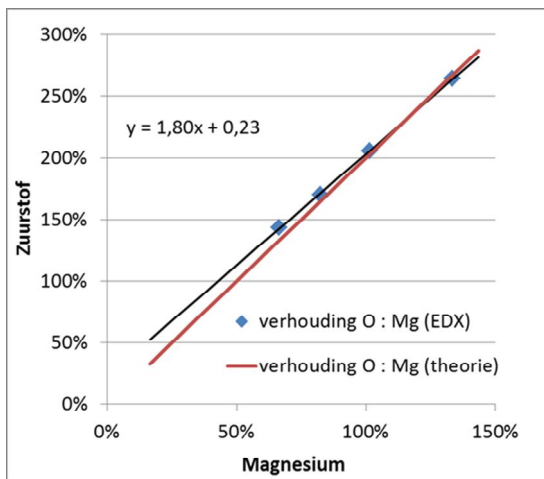
Figuur 4.16 EDX signaal Magnesium en Zuurstof ten opzichte van Silicium bij toenemende kV.



Figuur 4.17 Schematische structuur van chrysotielvezels.

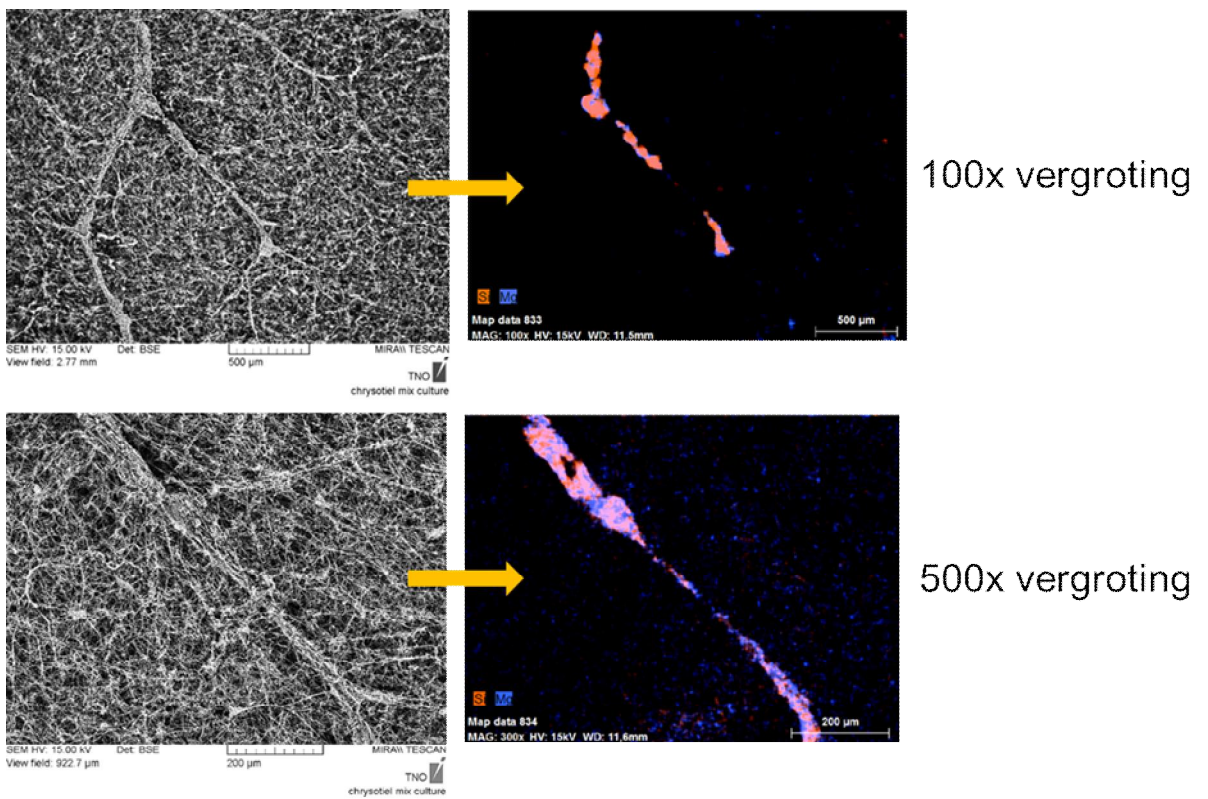


Figuur 4.18 EDX signaal Magnesium en Zuurstof ten opzichte van Silicium bij toenemende kV.



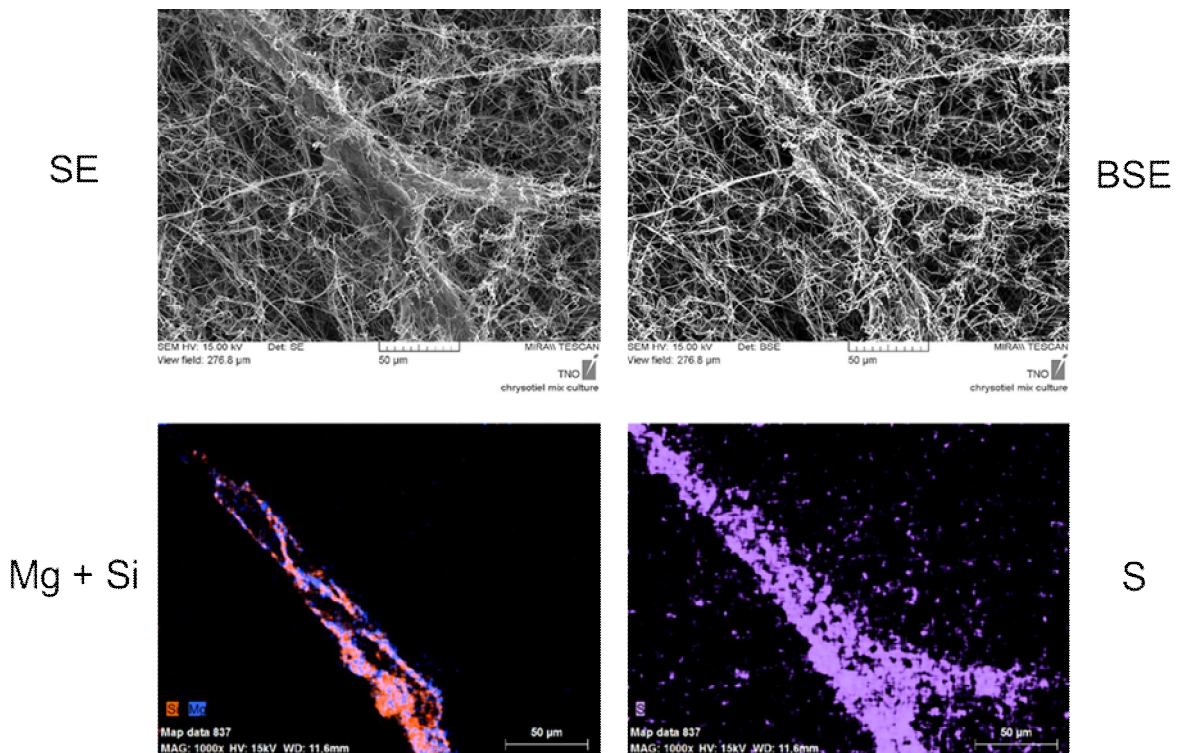
Figuur 4.19 Verhouding zuurstof (O) ten opzicht van Magnesium (Mg) in chrysotielvezels, zowel gemeten als theoretisch.

EDX mapping fotos laten duidelijk de asbestvezels ingekapseld door schimmeldraden zien (Figuur 4.20). De asbestvezels laten een duidelijk hogere concentratie Mg en Si zien.



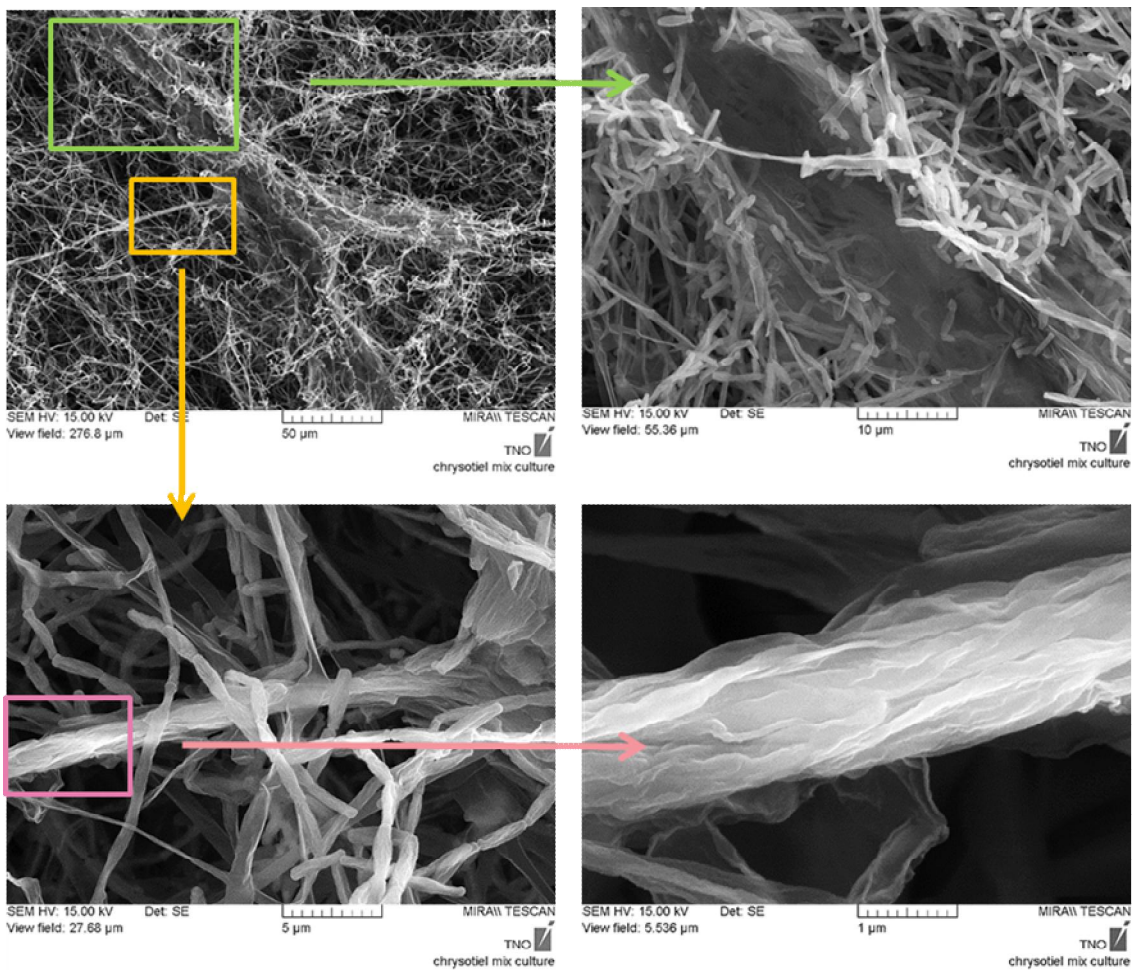
Figuur 4.20 EDX mapping mix culture + chrysotiel.

In Figuur 4.21 is een asbestvezel te zien die voor het grootste deel is opgelost. De vorm van de vezel is nog duidelijk zichtbaar door de vorm van de schimmelvezels waarmee deze is ingekapseld, maar Mg en Si blijken hier niet meer zo geconcentreerd aanwezig als in Figuur 4.20.



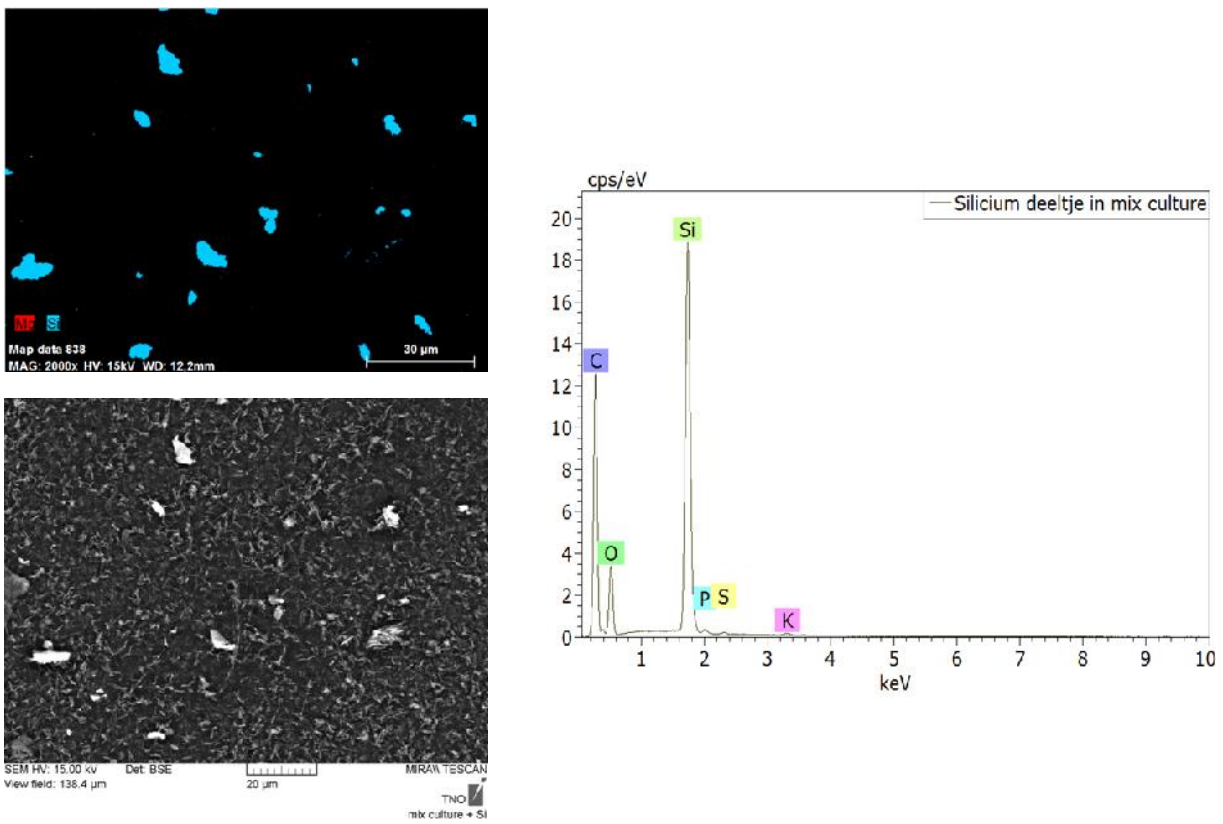
Figuur 4.21 EDX mapping mix culture + chrysotiel.

In Figuur 4.21 zijn asbestvezels in verschillende mate van afbraak te zien: de vezel in het groene kader (uitvergroting rechts) is grotendeels opgelost, terwijl de vezel in het oranje kader (uitvergroting onder) nog grotendeels aanwezig is.

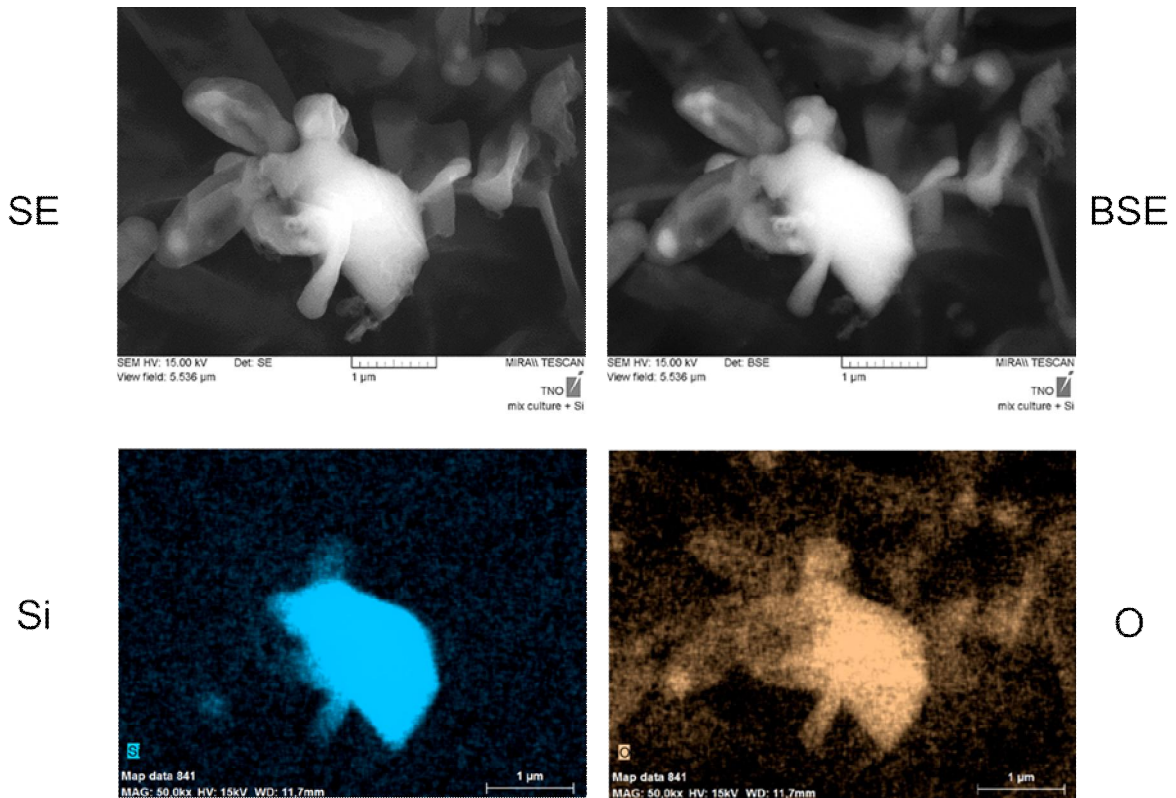


Figuur 4.22 SEM opnamen mix culture + chrysotiel.

Figuur 4.23 en Figuur 4.24 laten duidelijk de siliciumoxide deeltjes zien die gevormd worden na afbraak van het chrysotiel, zoals verwacht op basis van de reactievergelijking voor het oplossen van het asbest.

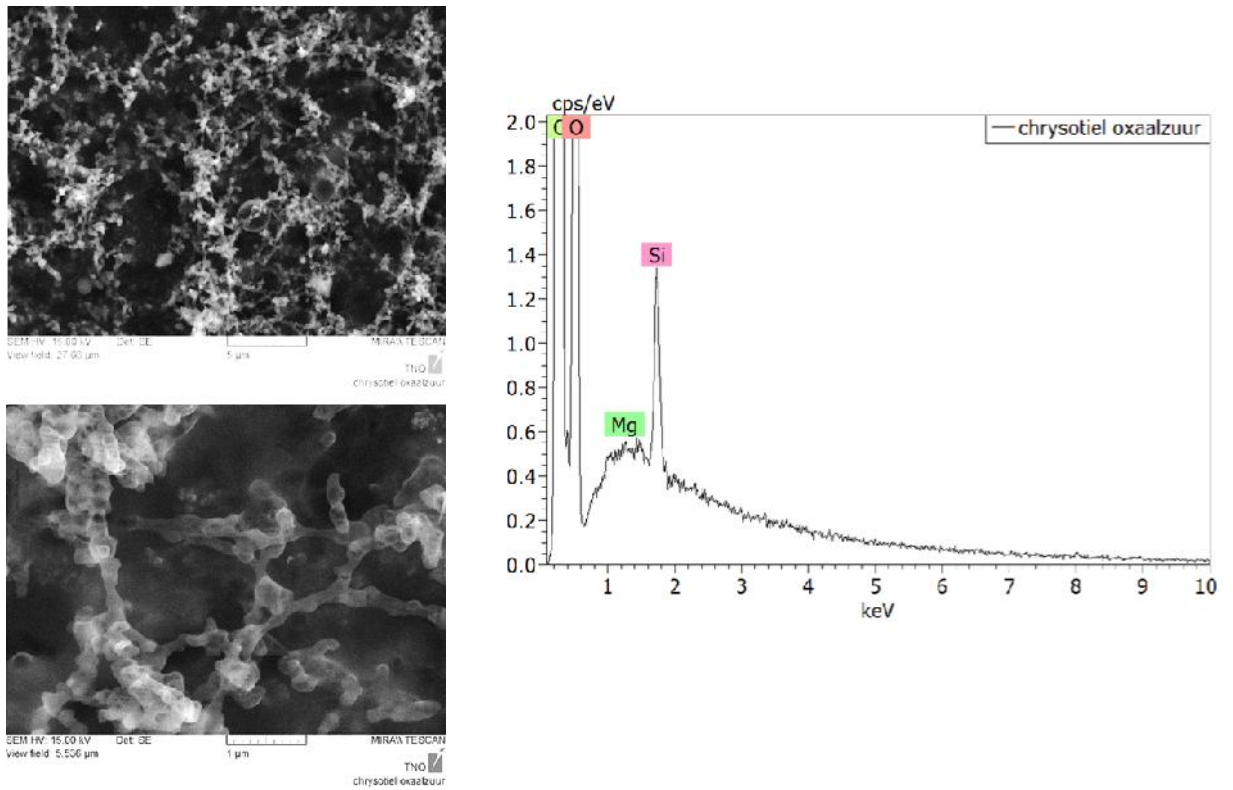


Figuur 4.23 Siliciumoxide deeltjes na afbraak chrysotiel.

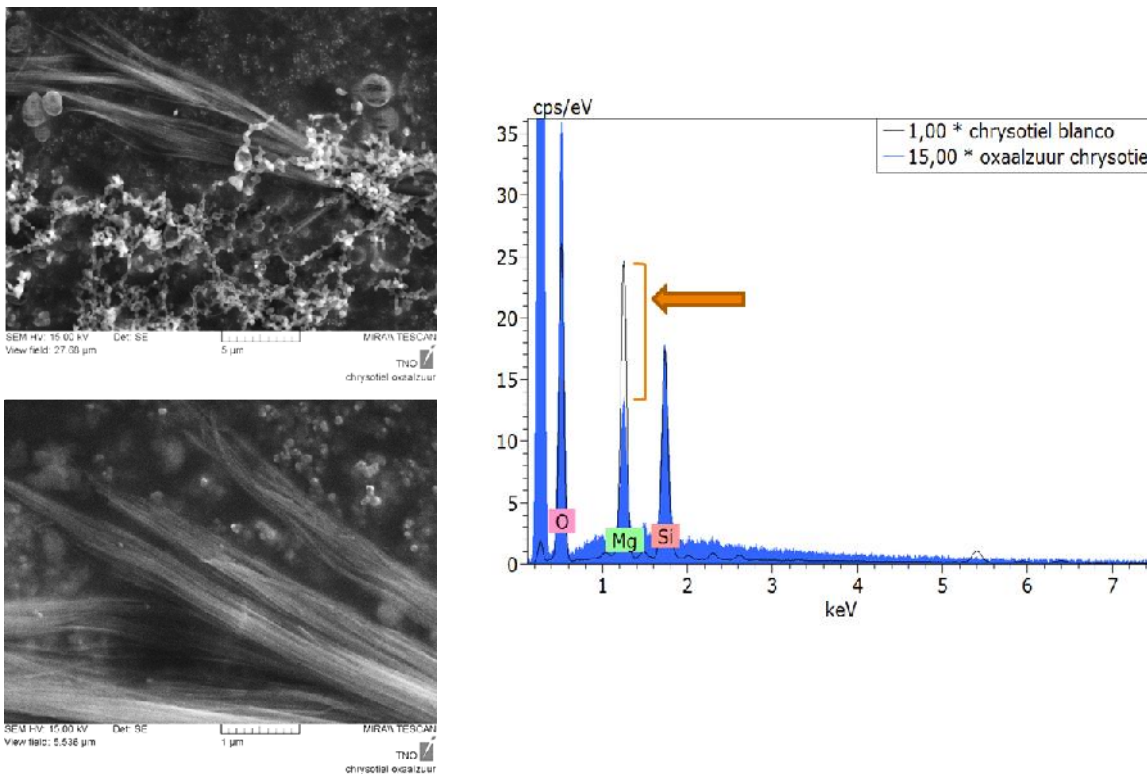


Figuur 4.24 EDX mapping siliciumoxide deeltje.

Bij de afbraak van chrysotiel wordt vooral duidelijk het verdwijnen van Mg uit de vezels waargenomen (Figuur 4.25 en Figuur 4.26).



Figuur 4.25 EDX mapping siliciumoxide deeltje.



Figuur 4.26 Afbraak chrysotiel door oxaalzuur.

Samenvatting microscopisch onderzoek:

Chrysotiel wordt goed afgebroken door schimmels en oxaalzuur, met als afbraakproducten magnesiumhydroxide en gehydrateerd amorf siliciumdioxide. De afbraak gaat laagsgewijs totdat de vezel volledig is verdwenen. Nog niet volledig afgebroken vezels zijn nog steeds kristallijn van vorm.

De afbraak van crocidoliet is niet aangetoond, wel blijkt het ijzergehalte iets te zijn afgenomen, echter dit heeft (vooralsnog) geen effect op de kristallijne vorm van crocidoliet.

Chrysotielvezels aan het oppervlak van de brokjes asbestcement worden afgebroken, maar zowel schimmels en oxaalzuur zijn niet in staat om de vezels in de kern aan te tasten.

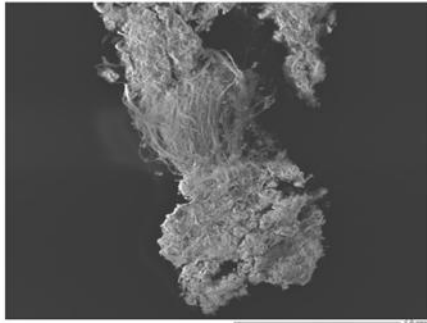
Microscopische inspectie asbestcementdeeltjes

In april 2017 is van 6 van de incubaties met asbestcement door Eurofins een foto met SEM microscopie gemaakt. In Table 4.2 is te zien welke volgende batches hiervoor zijn gebruikt. De foto's laten zien dat in alle gevallen nog duidelijk chrysotielvezels aanwezig waren (Figure 4.27).

Table 4.2 Asbestcement monsters die in april 2017 zijn gebruikt voor SEM analyse.

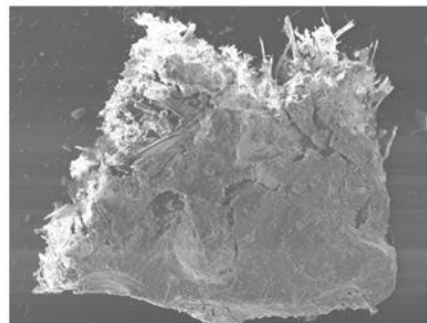
Sample name	Medium	component/fungi added
Batch 17 A	glucose	A. niger
Batch 17 B	glucose	A. niger
Batch 18 B	glucose	V. leptobactrum
Batch 20 B	MES	oxalic acid
Batch 21 B	glucose	Ø

5424539 Dry asbestos cement



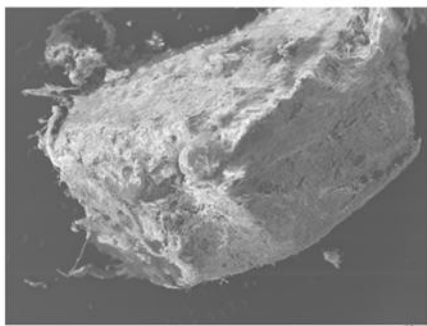
Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

5424531 Batch 17A



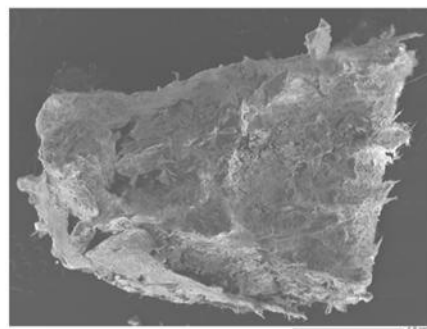
Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

5424532 Batch 17B



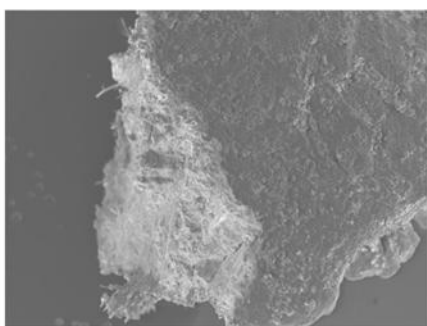
Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

5424533 Batch 18B



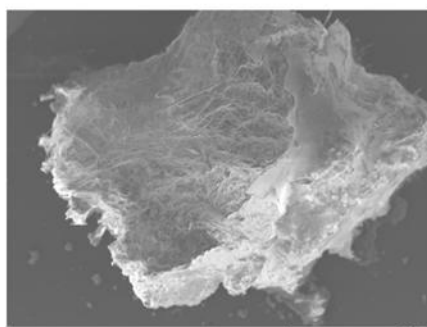
Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

5424534 Batch 20B



Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

5424535 Batch 21B



Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

Figure 4.27 Microscopische inspectie van asbestcementdeeltjes uit 6 incubaties van voorstudie. Alle figuren laten nog chrysotielvezels zien.

4.2 Optimalisering van groeicondities voor asbestafbraak door schimmels in grond

4.2.1 Schimmelkeuze

Van de drie stammen die geïsoleerd zijn uit asbestrotsen (*F. oxysporum*, *P. lilacinum* en *V. leptobactrum*) hebben twee stammen grote nadelen: *F. oxysporum* produceert een toxine dat giftig is voor planten en dieren, en *P. lilacinum* produceert een toxine voor nematoden (Fravel et al., 2003; Cayrol et al., 1989). Twee andere stammen werden geïsoleerd in het laboratorium: *A. creber* en een onbekende schimmel. Uit literatuuronderzoek bleek *A. creber* sterigmatocystine te kunnen produceren, een kankerverwekkend molecuul (Micheluz et al., 2016). *A. niger* is niet giftig voor mensen, dieren of planten en kan hoge hoeveelheden citroenzuur en oxaalzuur produceren in optimale condities (Strasser et al., 1994). Aangezien het proces in het veld toepasbaar moet zijn, zijn *V. leptobactrum* en *A. niger* gekozen om de experimenten uit te voeren.

4.2.2 Vochtigheid

Willekeurige schimmelgroei werd eerst onderzocht om de beste vochtomstandigheden te bepalen. Na twee weken groei met verschillende volumes medium bleek dat schimmels goed groeiden in bijna droge grond (20% medium) en in natte grond (40% medium). Deze twee condities werden gekozen voor de volgende stappen. De twee condities hebben hun eigen voordelen.

De droge grond stimuleert groei van de schimmels direct op het asbest en het uitscheiden van zuren en sideroforen die direct op het asbest aangrijpen. Tegelijkertijd hebben de schimmels onder deze omstandigheden goede beschikbaarheid tot zuurstof.

De natte grond zorgt voor een grote hoeveelheid zuren doordat er een grotere hoeveelheid substraat met het medium wordt aangeboden. Daarnaast is het bij natte grond gemakkelijker om vloeistofmonsters te nemen.

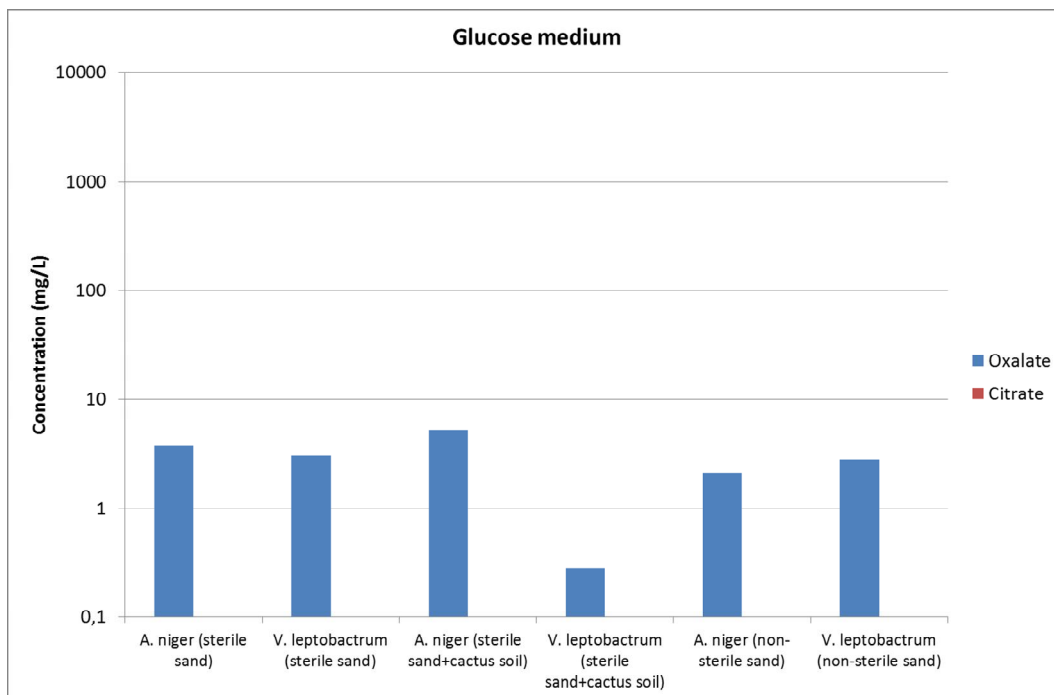
4.2.3 Media

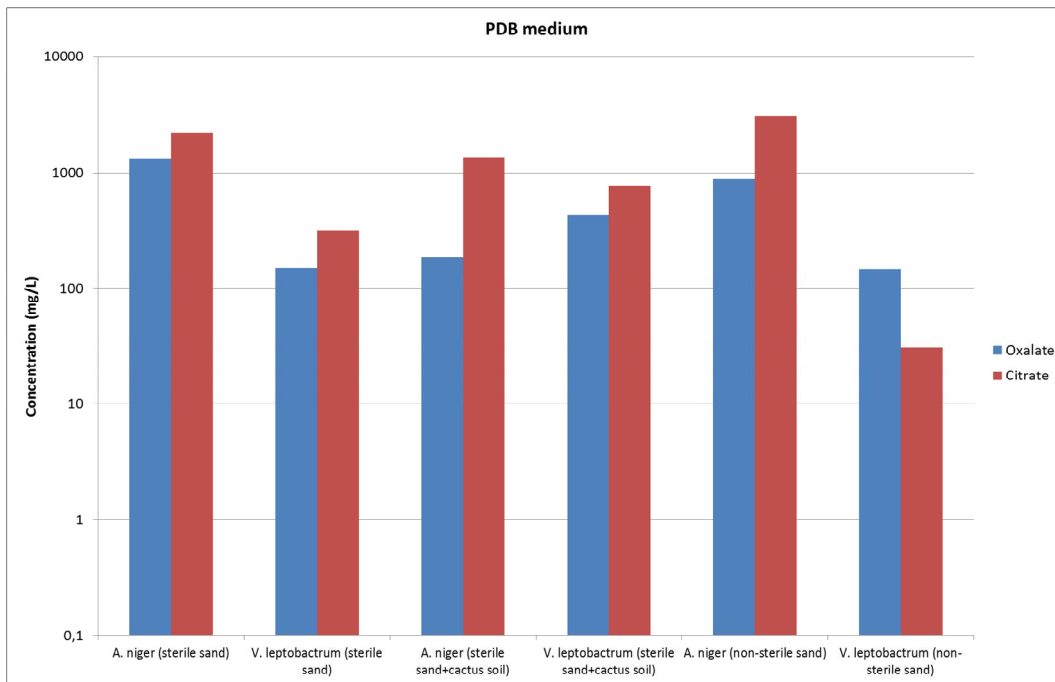
Wetende dat alle bestaande organismen minstens sporen van ijzer nodig hebben om te kunnen overleven, is glucose medium zonder ijzer gebruikt om de schimmels te kweken. Het verwachte effect was dat de schimmels dan het ijzerhoudende asbest zouden aanvallen om toegang te hebben tot ijzer. Het andere medium was Potato Dextrose Broth (PDB), een rijk medium dat snelle groei van schimmels stimuleert. Groei van *A. niger* en *V. leptobactrum* en productie van citroen- en oxaalzuur in de twee verschillende media werd bestudeerd. De zuurconcentraties werden gemeten in de batches die met een stuk schimmels werden geïnoculeerd van schimmels, en die 20 g grond 1 of 2 bevatten (zowel steriel als niet-steriel) en 14 ml medium. De zuurproductie bleek voor elke schimmel zeer verschillend te zijn, afhankelijk van het gebruikte medium. In het PDB medium was de zuurproductie 100 tot 1000 keer hoger dan in het medium met glucose (Figuur 4.28).

Bij het medium met glucose was er na 21 dagen alleen oxaalzuur geproduceerd door *A. niger* en *V. leptobactrum*. Ter vergelijking: na 12 dagen werden in het PDB medium citroenzuur en oxaalzuur geproduceerd in hoge concentraties (tussen 0,1 en 1 g/L). Schimmelgroei was ook sneller in het PDB dan het glucose medium (Figuur 4.29). Omdat er in het glucose medium geen ijzer was toegevoegd, was het vooraf de verwachting dat de door de schimmels geproduceerde zuren specifiek interactie zouden hebben met het ijzer van de asbest in plaats van die van het medium. Echter, in de situatie zonder asbest was er bijna geen ijzer beschikbaar. Daardoor was er weinig groei in dit glucose medium, en werden er minder zuren geproduceerd. PDB daarentegen bevatte ijzer afkomstig uit de aardappelen die gebruikt werden om het te bereiden. Eventueel geproduceerde ijzerbindende stoffen zullen dan ook zowel ijzer uit het medium als uit het asbest binden. De totale concentraties zuur die

geproduceerd werd is echter zoveel hoger voor PDB dan voor glucose-houdend medium, dat de in het PDB geproduceerde zuren alsnog meer ijzer zullen binden. Daarom is PDB als groeimedium gekozen voor de rest van het project.

Om te bevestigen dat PDB een goed medium was om te gebruiken, is siderofoor productie in dit medium geanalyseerd. Eerst is een standaardanalyse uitgevoerd met EDTA in water of VBB met behulp van de CAS-analyse. Het bleek dat zelfs zonder EDTA de ijzerconcentratie van chelerende moleculen in het PDB zeer hoog was vergeleken met water (Figuur 4.30). Om te bevestigen dat de kleurreactie inderdaad te danken was aan dit soort moleculen, is het oplossen van neergeslagen FeCl_3 werd onderzocht. Als ijzer-chelerende moleculen aanwezig zouden zijn in de oplossing, zou het neergeslagen ijzer worden opgelost. Dat is waargenomen met PDB en niet met water (Figuur 4.31). Dit bevestigde dat ijzerbindende moleculen in het PDB waren die reageerden tijdens de CAS-analyse, en dat zelfs zonder schimmels hun concentratie hoog was (tenminste equivalent aan 10 g/L EDTA). Deze resultaten versterken de keuze van het PDB als groeimedium. Omdat het niet mogelijk was om de colorimetrische resultaten tussen de verschillende concentraties van de PDB standaard te onderscheiden, is de CAS-analyse niet uitgevoerd op de monsters.

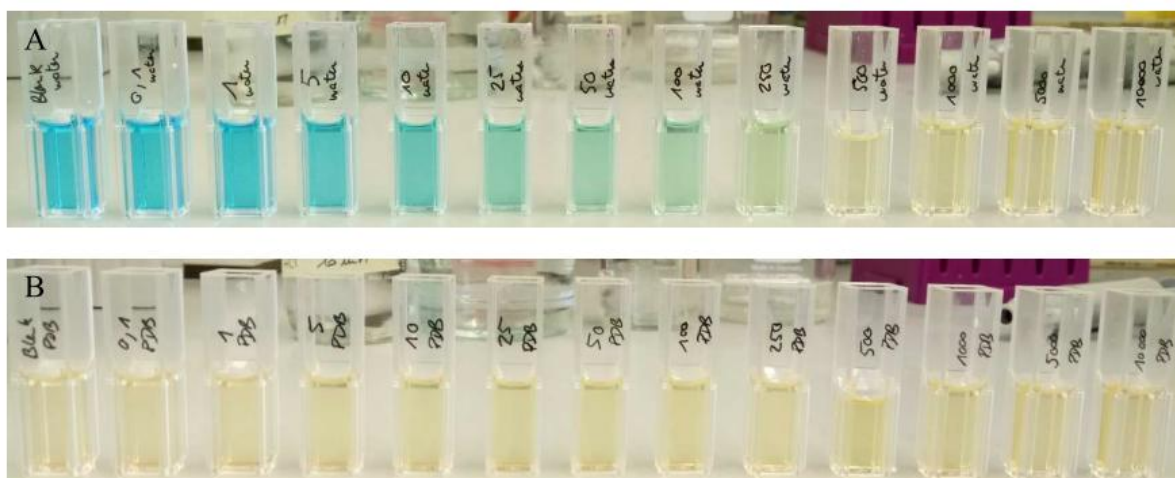




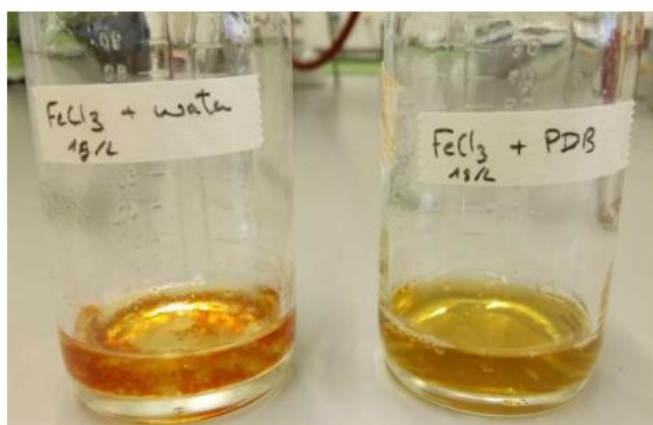
Figuur 4.28 Zuurproductie door schimmels onder natte condities met verschillende media en grondsoorten. A: zuur concentratie in batches met glucose medium na 21 dagen; B: zuur concentratie in batches met PDB na 12 dagen; 20 g grond 1 of 2 werd geïnoculeerd met 14 mL glucose medium of PDB, en geïnoculeerd met A. niger of V. leptobactrum



Figuur 4.29 Groei van A. niger en V. leptobactrum bij verschillende condities zes dagen na inoculatie. De batches zijn geïnoculeerd als in Tabel 3.2. Flessen 1 tot 16 zijn geïncubeerd met glucose medium; de andere met PDB. Voor degene met A. niger (oneven nummers), werd een zwarte laag conidia zichtbaar onder natte en droge condities. V. leptobactrum vormde bij groei witte vlekken.



Figuur 4.30 CAS assay resultaten met water and PDB standaarden. A: water standaard; B: PDB standaard. De CAS oplossing was blauw bij afwezigheid van ijzerbindende stoffen, en kleurloos bij aanwezigheid. EDTA is gebruikt als referentie voor ijzerbindende moleculen. De getallen op de cuvetten geven de concentraties EDTA weer in mg/L.



Figuur 4.31 Experiment om de aanwezigheid van ijzerbindenden moleculen te bepalen. 1 g/L FeCl_3 was toegevoegd aan 10 mL water of PDB. 0.18 mL 1 M NaOH was toegevoegd om de vorming van HCl uit H_2O and FeCl_3 te voorkomen. In het geval van PDB zorgden ijzerbindende moleculen voor het oplossen van ijzer uit FeCl_3 . In water gebeurde dit niet en sloeg de FeCl_3 neer(oranje).

4.3 Afbraak van asbestcement

4.3.1 Selectie van zuur voor afbraak van asbestcement en bufferen

Om de afbraak van asbestcement door zuren te onderzoeken, zijn automatische zuur titraties uitgevoerd met respectievelijk HCl en een mengsel van citroenzuur en oxaalzuur. De resultaten laten zien welk zuur beter is voor de buffering en voor de asbest-cementafbraak. Na zeven weken werd het volume van de zuren die bij de titraties verbruikt was, gemeten. In het geval van 1M HCl was 145 ml opgenomen om de pH van de oplossing pH onder 7. Voor 0,5 M citroenzuur en 0,5 M oxaalzuur werd slechts 27 ml gebruikt. Het citroen- en oxaalzuur lijkt een betere bufferactiviteit te hebben omdat minder nodig is om de pH laag te houden. Bovendien zou HCl gevaarlijk zijn voor het milieu indien gebruikt in grote hoeveelheden. Citroenzuur en oxaalzuur daarentegen zijn organische zuren die door organismen worden

geproduceerd en reeds aanwezig zijn in het milieu. Dat betekent dat kleine hoeveelheden hiervan niet te veel effect zouden hebben. Er is gekozen om de citroenzuur en oxaalzuur in combinatie te gebruiken om het asbestcement te degraderen voor de optie met alleen zuur. Door de automatische titratie, de minimale concentratie van deze zuren om asbestcement te degraderen was vastbesloten. Degradatie van cement verhoogde de pH, dus zodra de pH laag en stabiel was, werd de minimale concentratie zuren gemeten. Deze werd vastgesteld op 0.175 M van elk van beide zuren. Bovendien verdween in de meeste kolommen van het trickling filter het citroenzuur veel langzamer dan oxaalzuur, zelfs in omstandigheden waar geen groei werd waargenomen. Het betekent dat citroenzuur zelf een goede bufferactiviteit bij lage pH heeft. Daarom werd citroenzuur gekozen als buffer van de asbestcement voor de incubaties met schimmels. Kleine stukken van 5 mm asbestcement werden in verschillende volumes 1 M citroenzuur geplaatst. Voor een klein stukje van 0,3 g was 0,1 ml genoeg om de pH van het cement tenminste een week te bufferen rond pH 8. Bij asbestcement van grootte 1-8 mm, bleek 333 ml/kg 1 M citroenzuur nodig te zijn.

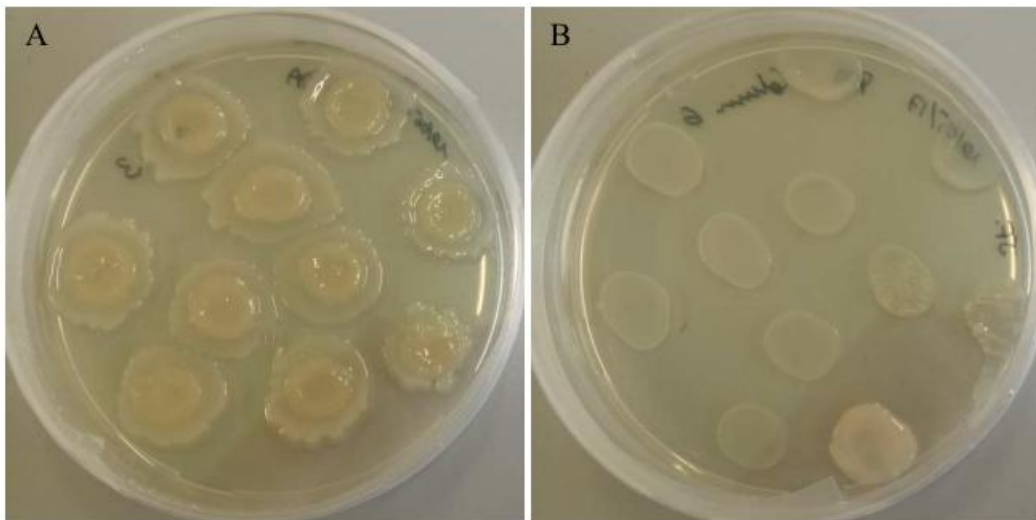
4.3.2 Asbestcement in kolommen

Schimmelgroei, pH en zuurproductie zijn in trickling filter kolommen gevolgd gedurende de tijd (Figuur 4.38). Gedurende de eerste 20 dagen was de pH in de kolommen met asbestcementstukken kleiner dan 8 mm zeer hoog, ongeveer 11. Dit werd veroorzaakt door het cement aanwezig in de asbest-cement stukken. Het bestaat voornamelijk uit calcium oxide, die in contact met water en lucht calciumcarbonaat en hoge pH produceert. Gedurende deze periode werden geen zuren geproduceerd, omdat de bestudeerde schimmels niet hadden kunnen groeien bij hoge pH. De hoge starthoeveelheid citroenzuur was te danken aan het PDB zelf. In het geval van de kolommen die asbestcement-stukken van 8 tot 16 mm bevatten, is de pH niet toegenomen en bleef ongeveer 7. Dit kan worden verklaard door het feit dat grote stukken een kleiner blootgesteld oppervlak cement hebben in vergelijking met hetzelfde gewicht van kleinere stukken. In deze kolommen werd oxaalzuurproductie waargenomen. De productie was hoog in de kolom geënt met *A. niger*. Na 14 dagen incubatie begon de hoeveelheid oxaalzuur echter te dalen. Een hypothese hiervoor is dat het oxaalzuur reageerde met het asbestcement, waarbij calcium- en/of magnesiumoxalaat geproduceerd werd, en de productie van het oxaalzuur was niet groot genoeg om de concentratie constant te houden.

Het zuurstofgehalte in de flessen onder de kolommen werd gemeten. In de twee kolommen met asbest-cementstukken van 8 tot 16 mm werd minder dan 5% O₂ gemeten. Dit bevestigde dat organismen groeiden in deze kolommen en dat het waarschijnlijk te wijten was aan gebrek aan O₂ dat de oxaalzuurproductie afnam. In de andere kolommen werd bevestigd dat er geen significante groei van schimmels optreedt: hier was het O₂ percentage na 14 dagen incubatie 21%. In kolommen 5 (1-8 mm asbestcement + onbekende schimmel) en 7 (<1 mm asbestcement + *V. leptobactrum*) verminderde het O₂-percentage drastisch op de 22e dag. Er was minder dan 2% O₂ aanwezig in deze kolommen. Dat bewees dat er iets groeide. Bovendien stegen de concentraties oxaalzuur en citroenzuur na de afname van O₂. Dit suggereert dat er in deze kolommen iets is gegroeid dat deze zuren produceert. In kolom 5 werden citroenzuur en oxaalzuur geproduceerd in hoge hoeveelheden (respectievelijk 100 mg/L en 300 mg/L), terwijl in kolom 7 alleen oxaalzuur was geproduceerd. Het is mogelijk dat gedurende de tijd dat de pH hoog was, er kleine niches werden gecreëerd waar de schimmelsporen werden beschermd tegen de hoge pH. Een hypothese is dat de schimmels kleine hoeveelheden zuren hebben geproduceerd, die voldoende was om de pH te verlagen en uiteindelijk beter te groeien en meer zuren produceren.

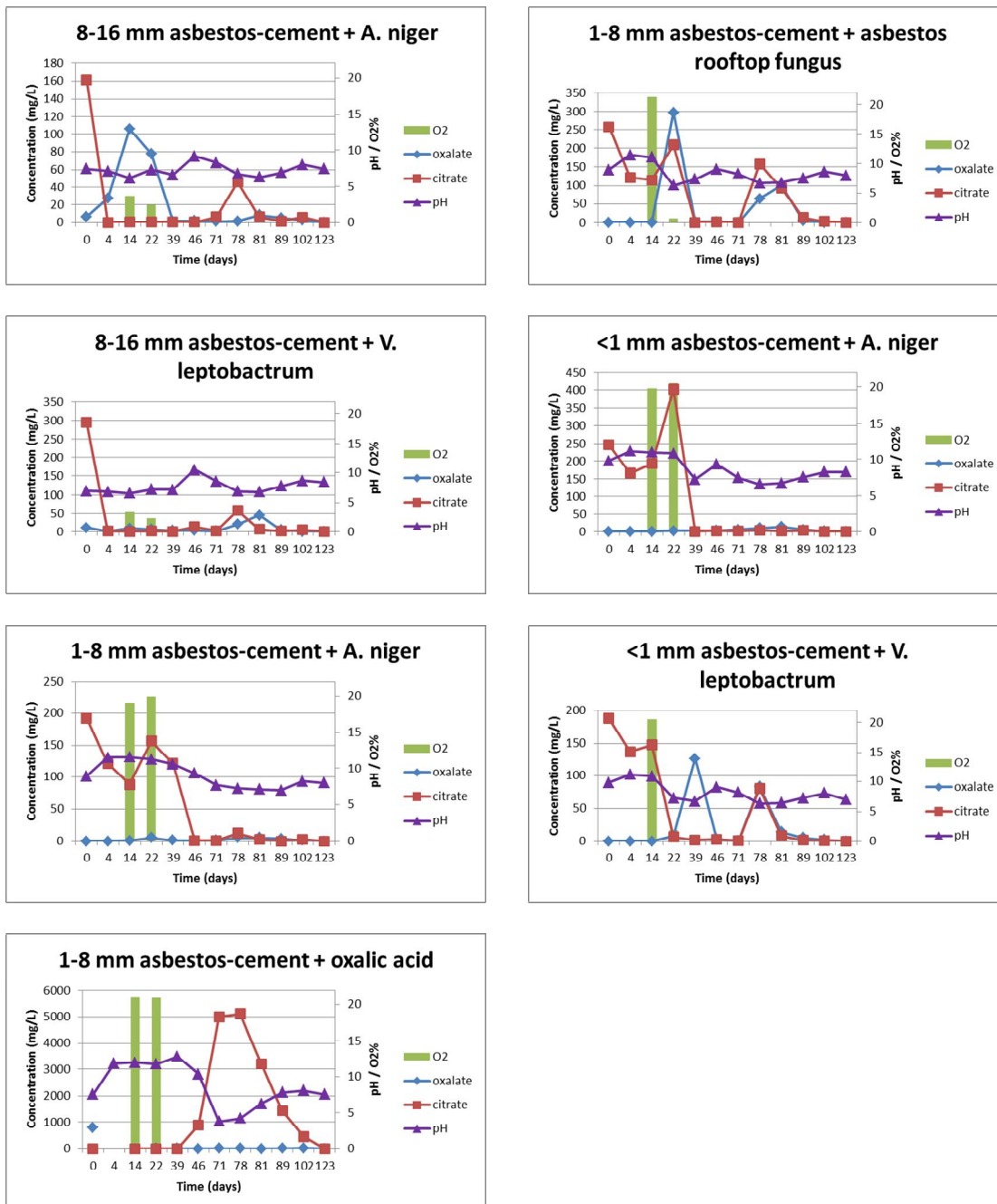
In kolommen 3 (1-8 mm asbestcement + *A. niger*) en 6 (<1 mm asbestcement + *A. niger*), werd geen afname van O_2 waargenomen, maar er werd wel een beetje citroenzuur geproduceerd.

De organismen die citroenzuur produceren, zouden fermenterende organismen kunnen zijn. Enkele druppels van deze twee kolomoplossingen werden op PDA-platen geplaatst en het bleek dat de organismen die aanwezig waren in deze kolommen bacteriën waren (Figuur 4.32).



Figuur 4.32 Isolatie van organismen aanwezig in kolom 3 en 6. A: organismen aanwezig in kolom 3; B: organismen aanwezig in kolom 6. De organismen werden geïsoleerd op PDA platen na twee maanden na inoculatie van de kolommen. De gegroeide organismen waren in beide gevallen glimmend en niet mat en pluizig, wat suggereert dat het bacteriën zijn.

Uiteindelijk heeft het filterproces veel nadelen. Om schimmels te hebben en te groeien onder aërobe omstandigheden moeten de kolommen open gehouden worden, wat het mogelijk maakt dat andere organismen groeien en misschien zelfs de schimmels doden. De groei van schimmels is ook erg traag en er wordt niet veel zuur geproduceerd. Bovendien is het meest nadelige aspect dat wanneer er eenmaal groei ontstaat, de kolommen verstoppert.



Figuur 4.33 pH, oxaalzuur- en citroenzuurconcentratie, en O₂ percentages in de trickling filter model kolommen: 1: kolom 1, 8 tot 16 mm asbestcement, A. niger; 2: kolom 2, 8 tot 16 mm asbestcement, V. leptobactrum; 3: kolom 2, 1 tot 8 mm asbestcement, A. niger; 4: kolom 4, 1 tot 8 mm asbestcement, 0.2 M oxaalzuur; 5: kolom 5, 1 tot 8 mm asbestcement, onbekende schimmel; 6: kolom 6, < 1 mm asbestcement, A. niger; 7: kolom 6, < 1 mm asbestcement, V. leptobactrum. Let op: schalen verschillen. In figuur 4 zijn er geen meetpunten voor citroenzuur en oxaalzuur op dag 4; op die dag zijn deze stoffen niet gemeten.

4.3.3 Asbestcement in baffled bottles

Parallel aan het trickling filter experiment zijn dezelfde parameters onderzocht met baffled flessen met asbestcement van groottefractie (1-8 mm) en rollend op een rolmixer. Bij deze experimenten werden dezelfde waargenomen als bij de trickling filters: de pH was zeer hoog

door het cement en de zuurstof nam snel af omdat de flessen waren gesloten. In deze flessen werd geen groei en geen zuurproductie waargenomen.

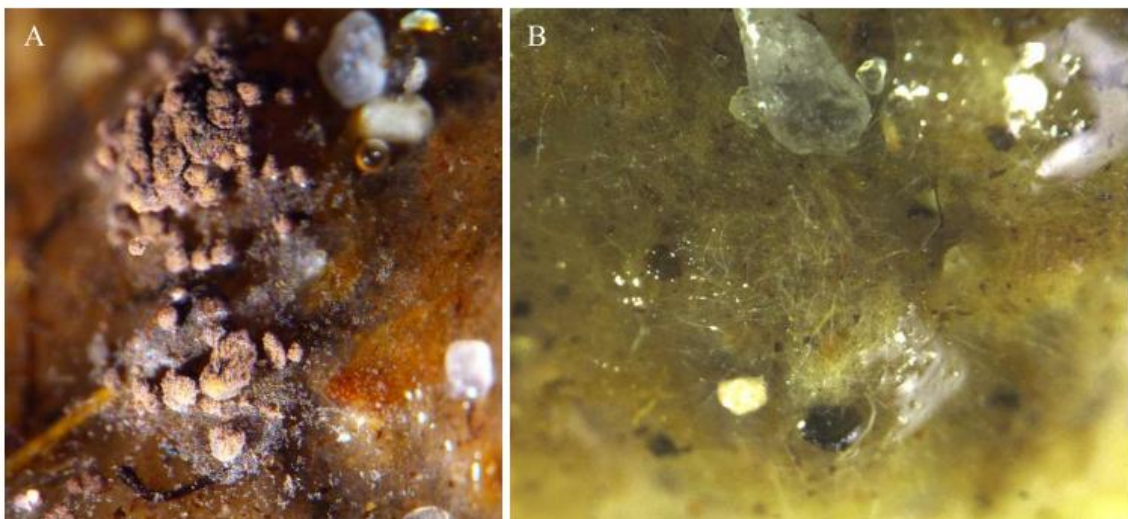
De volgende stap voor het cementmixermodel was om te bevestigen dat schimmels kunnen groeien onder mechanische beweging. Op een proefbuisrotator die met 9 rpm draaide, bleken schimmels met PDB te kunnen groeien, evenals in PDB en bodem twee. Foto's werden genomen na 2 maanden incubatie (Figuur 4.34) en citroenzuur- en oxaalzuurproductie werd gemeten.

Mechanische beweging zorgde ervoor dat de schimmels groeiden en secundaire metabolieten produceerden. Deze beweging had het voordeel dat het asbestcement en de PDB gemengd werden en daardoor de afbraakactiviteit verhoogd werd doordat kleinere asbestdeeltjes te vormen.

In april 2017 zijn van drie flesjes asbestcementmonsters genomen en met SEM geanalyseerd door Eurofins.

Vanwege deze mechanische activiteit en de nadelen van het trickling filter, lijkt de cement mixer de beste optie voor een pilot.

Op basis van de gegevens met de trickling filter en cement mixer modellen concluderen we dat de grote asbestcementstukken te groot waren om snel te worden afgebroken en de kleinste te ingewikkeld om op grote schaal te verkrijgen. Daarom hebben we een groottefractie van 1 tot 8 mm gekozen. Bij het gebruik van deze grootte moest de pH echter eerst tot lage tot neutrale pH gebufferd worden om groei van de schimmels mogelijk te maken.

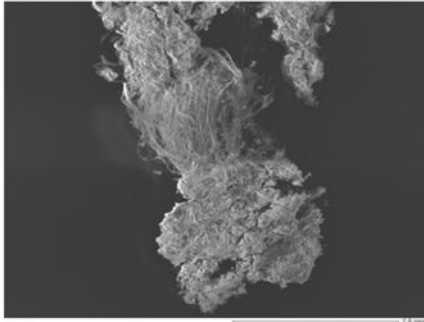


Figuur 4.34 Schimmels die gegroeid waren in de rollende flessen met PDB en bodem 2. A: *A. niger* (16X) in de steriele rollende flessen met 20 g bodem 2 en 14 ml PDB; B: *V. leptobactrum* (32X) in de steriele rollende flessen met 20 g bodem 2 en 14 ml. PDB. A. *niger* vormt zwarte conidia op het oppervlak van het medium en de grond, terwijl *V. leptobactrum* witte hyphen vormt.

Table 4.3 Asbestcementmonsters die in april door Eurofins met SEM geanalyseerd zijn.

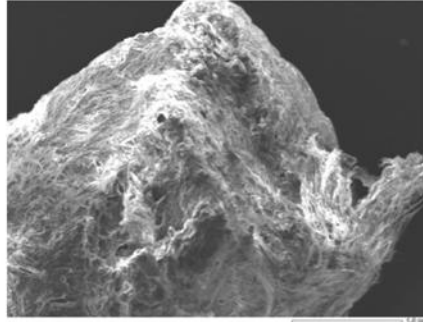
Monster	Medium	Toevoeging
Baffled bottle 1bis	PDB	Oxaalzuur en citroenzuur (dode <i>A. niger</i>)
Baffled bottle 3	PDB	(dode <i>V. leptobactrum</i>)
Baffled bottle 8	PDB	HCl
Droog asbestcement	Geen	Geen

5424539 Dry asbestos cement



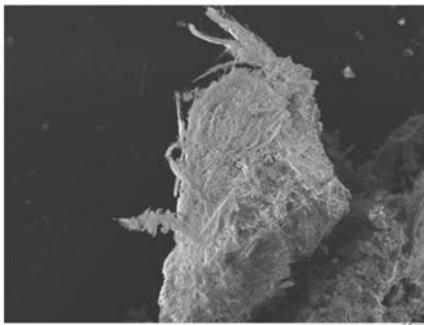
Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

Aspergillus



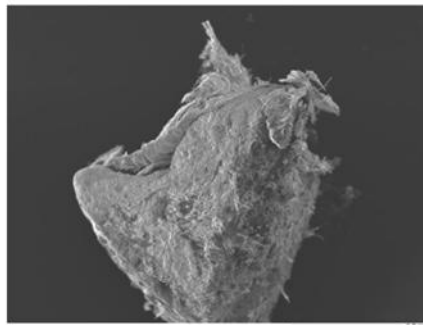
Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

Verticillium



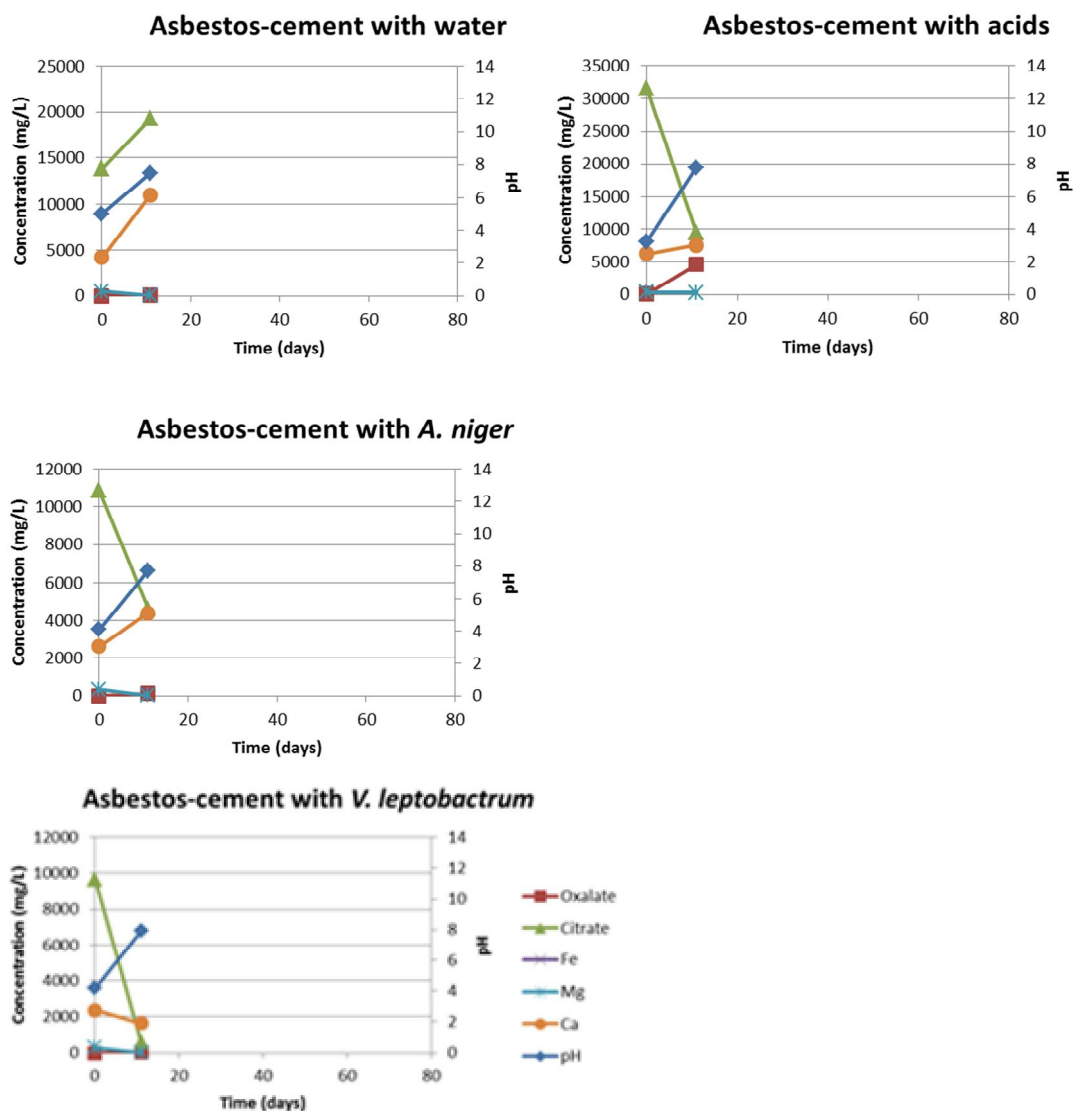
Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

Blanco



Asbest Cement, De uitstekende vezels zijn Chrysotiel vezels

Figuur 4.35 SEM fotos van asbestcementmonsters uit rollende flessen, april 2017. In alle gevallen is nog chrysotiel te zien.



Figuur 4.36 Concentraties oxalaat, citraat, Fe, Mg, Ca, en pH in asbestcement incubaties.

4.4 Afbraak van chrysotiel in grond

4.4.1 Invloed van mengregime

Zoals eerder gezegd, waren schimmels in staat te groeien in medium en grond nr 2 bij ronddraaien met 9 rpm. Dezelfde waarneming werd gedaan bij ronddraaien met 10 rpm wat dichterbij de echte cementmixerbeweging ligt. De rollende en roterende flessen die werden gebruikt in eerdere experimenten werden afgesloten met caps met septa die lekken voorkomen, maar ook zuurstof doorlaten. Nieuwe caps met fijn schuim werden ontworpen en hun doorlaatbaarheid voor O₂ was gemeten. Door het verplaatsen van flessen van anaërobe naar aërobe omgeving, is het O₂ percentage in de flessen te schakelen tussen 2% en 21% in minder dan 10 minuten. Met behulp van deze schuim caps kon de groei en de activiteit van *A. niger* en *V. leptobactrum* onder verschillende mengomstandigheden worden bestudeerd (Figure 4.37). De optimale condities om schimmels in grond te laten groeien die eerder was bepaald, werden gebruikt: een vochtgehalte van 40% w/w, PDB als medium en bodem twee

als de Nederlandse bodemreferentie. Na twee weken incubatie onder continue rollen, continue stilstaan, of afwisselend stilstaan en rollen, was er in alle flesjes behalve degenen die niet geïnoculeerd waren schimmelgroei zichtbaar. Bij voortdurend rollen werden de grootste hoeveelheden oxaalzuur geproduceerd door *A. niger*. De grootste hoeveelheden magnesium en calcium werden opgelost door *A. niger*, onder elke omstandigheid. Ter vergelijking: bij voortdurend stilstaan produceerde *A. niger* zeer hoge hoeveelheden citroenzuur en zeer lage hoeveelheden oxaalzuur. De echte hoeveelheid oxaalzuur kon niet worden bepaald voor elke conditie omdat er een grote kans was dat het neergeslagen was met calcium en/of magnesium. Onder deze toestand ontbrak het de schimmel zuurstof omdat er zich bij stilstand een laag schimmel vormde bovenop het oppervlak, waardoor zuurstof moeilijk bij de rest van de schimmel kon komen. *V. leptobactrum* produceerde bij afwisselend bewegen en stilstaan de grootste hoeveelheden zuren. Onder deze omstandigheden werden grote hoeveelheden magnesium en calcium opgelost. Concluderend kon gesteld worden dat afwisselend mengen en stilstaan de beste conditie is voor een pilot. Dit zorgt voor voldoende afbraak van de asbestvezels door mechanische activiteit, en voorkomt dat de cementmixers oververhit raken bij te veel onafgebroken beweging. De productie van oxalaat door *A. niger* was echter hoger bij voortdurend bewegen, en daarom lijkt een verhouding van 1 uur bewegen en 5 uur stilstaan optimaal.

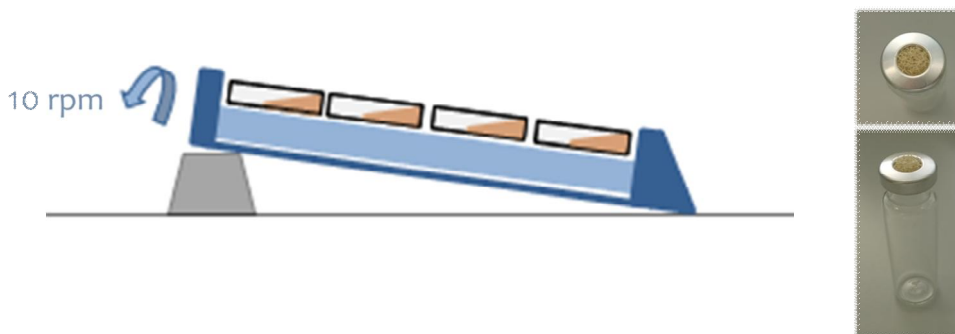
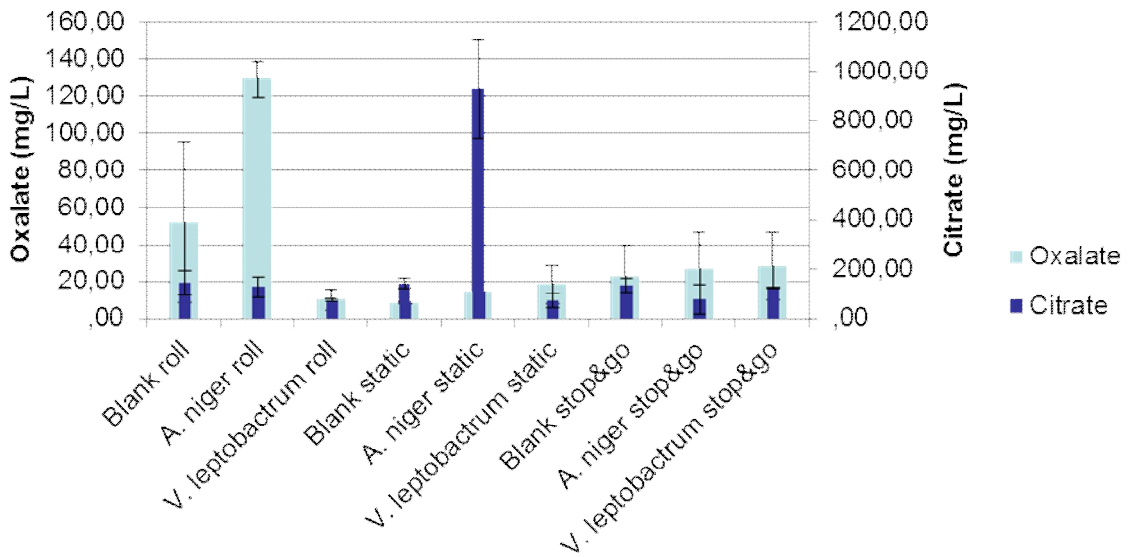
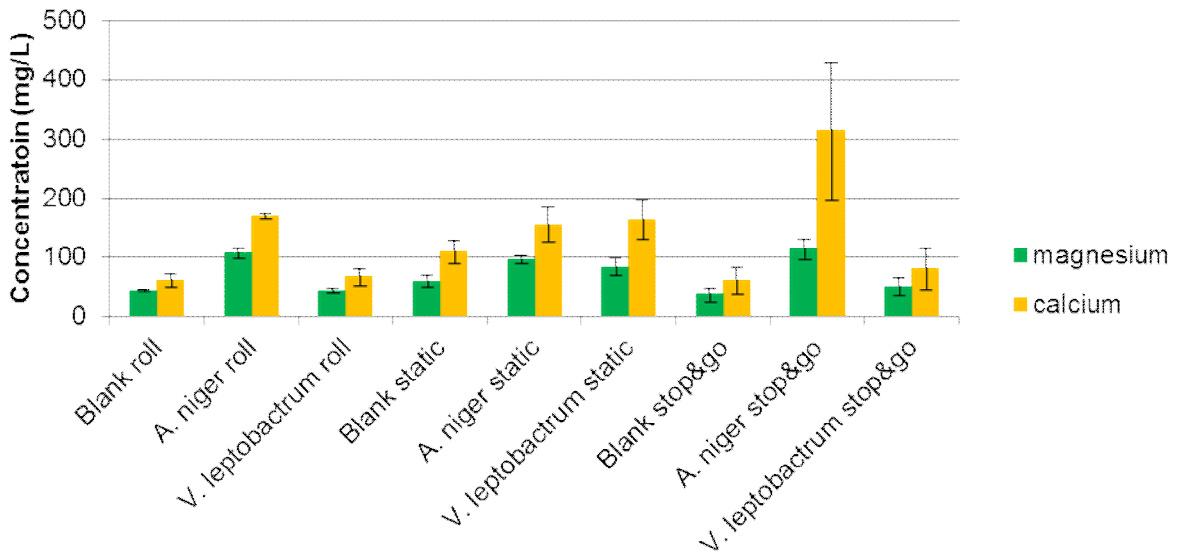


Figure 4.37 Rolopstelling voor pre-pilot experimenten.

Acids produced by fungi in different mixing conditions



Elements dissolved by fungi in different mixing conditions



Figuur 4.38 Zuren geproduceerd en elementen vrijgekomen bij incubatie van schimmels met asbest onder verschillende omstandigheden.

4.4.2 Afbraak van chrysotiel in grond

Omdat in monsters met grond geen afwisseling van 1 uur rollen en 5 uur stilstaan kon worden toegepast, werd het volgende experiment uitgevoerd bij voortdurend rollen. De chrysotiel afbraakactiviteit van *A. niger*, *V. leptobactrum* en de productie van citroen- en oxaalzuur werd onderzocht in mengsels van zuivere chrysotielvezels met grond twee en PDB (Tabel 3.7). Dezelfde optimale condities als hierboven werden gebruikt. De data van T0, T1 en T2 (twee weken na inoculatie voor T1 en anderhalve maand na inoculatie voor T2) werden geanalyseerd, degenen voor T3 nog niet beschikbaar (Figure 4.39).

Wanneer we de resultaten van deze experimenten vergelijken met die van de voortdurend rollende toestand van het vorige experiment, zien we dat de concentratie van magnesium in oplossing in aanwezigheid van chrysotiel veel hoger dan zonder. Hieruit kon worden afgeleid dat het grootste deel van het opgeloste magnesium uit chrysotiel was geëxtraheerd en dat het asbest in de verschillende omstandigheden inderdaad minder werd afgebroken. Alleen met water werd geen productie van zuren waargenomen zoals verwacht en kleine hoeveelheden calcium en magnesium werden opgelost, waarschijnlijk vanwege de mechanische activiteit. Bij alle omstandigheden met schimmels is de pH verhoogd tot 8 en de zuurconcentraties daalden drastisch. Dit zou kunnen komen doordat deze zuren gereageerd hebben met het asbest, en niet genoeg door de schimmels geproduceerd werden om deze reactie met het asbest te evenaren.

Als het oplossen van magnesium gebruikt zou worden om de chrysotielafbraak te bepalen, zou meer magnesium in oplossing meer chrysotielafbraak betekenen. Op die manier was het mogelijk om de chrysotiel afbraak tussen de verschillende omstandigheden te vergelijken en te bepalen onder welke condities het meeste asbest afgebroken werd. In de gevallen van incubaties met *V. leptobactrum* werden alleen resultaten waargenomen die vergelijkbaar waren met incubatie zonder schimmels en met alleen PDB. De hoeveelheden magnesium opgelost na de verschillende incubatietijden waren zeer vergelijkbaar, tussen 325 mg/L en 375 mg/L bij T1 en tussen 75 mg/L en 150 mg/L bij T2. De rest van de parameters ontwikkelen zich ook op dezelfde manier met zowel *V. leptobactrum* of PDB. Hieruit kan worden geconcludeerd dat *V. leptobactrum* geen goede schimmel is om zuiver chrysotiel onder deze omstandigheden te degraderen.

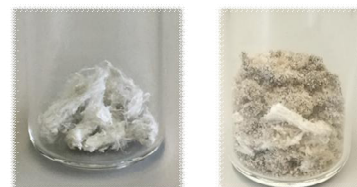
Met alleen *A. niger* of *A. niger* gemengd met *V. leptobactrum*, werd maximaal 450 mg/L magnesium opgelost bij 0,1 ml *A. niger*, 500 mg/L bij 5 ml *A. niger*, en 600 mg/L bij een mengsel van *A. niger* en *V. leptobactrum*. In de laatste twee gevallen is de magnesiumconcentratie in oplossing na 43 dagen niet zo sterk gedaald als in de eerder genoemde gevallen: het bereikte respectievelijk 275 mg/l en 400 mg/l. Bovendien verhoogde de oxalaatconcentratie licht in deze twee omstandigheden. Met hoge hoeveelheden *A. niger* of gecombineerd met *V. leptobactrum* werden meer zuren geproduceerd die de afname door reactie met asbest konden compenseren en ervoor zorgden dat magnesium beter opgelost werd. Hieruit kan worden geconcludeerd dat *A. niger* de beste schimmel is om zuiver chrysotiel te af te breken.

Niettemin lijkt de beste manier om zuiver chrysotiel af te breken het gebruik van citroen- en oxaalzuur. Afgezien van het feit dat de calciumconcentratie die werd gemeten een beetje lager was dan bij de andere omstandigheden en de constante zure pH, werd met zuren een veel sterkere asbestafbraak gemeten. De citroenzuurconcentratie was constant en ongeveer 17000 mg/L, wat aantoonde dat het niet dit zuur was dat het grootste effect had op het oplossen van magnesium en de afbraak van chrysotiel. Anderzijds daalde de oxalaatconcentratie drastisch, van 11000 mg/L tot 1000 mg/L, terwijl de magnesiumconcentratie toenam tot 2000 mg/L. Dit bevestigde dat oxaalzuur een rol speelt bij het oplossen van magnesium. Mogelijk houdt het citroenzuur de pH laag, waardoor het

29 september 2017, concept

oxaalzuur een optimaal effect heeft op het oplossen van Mg uit asbest. Het lijkt erop dat deze combinatie van zuren het meest effectief is voor de afbraak van chrysotiel.

Vials rolling continuously



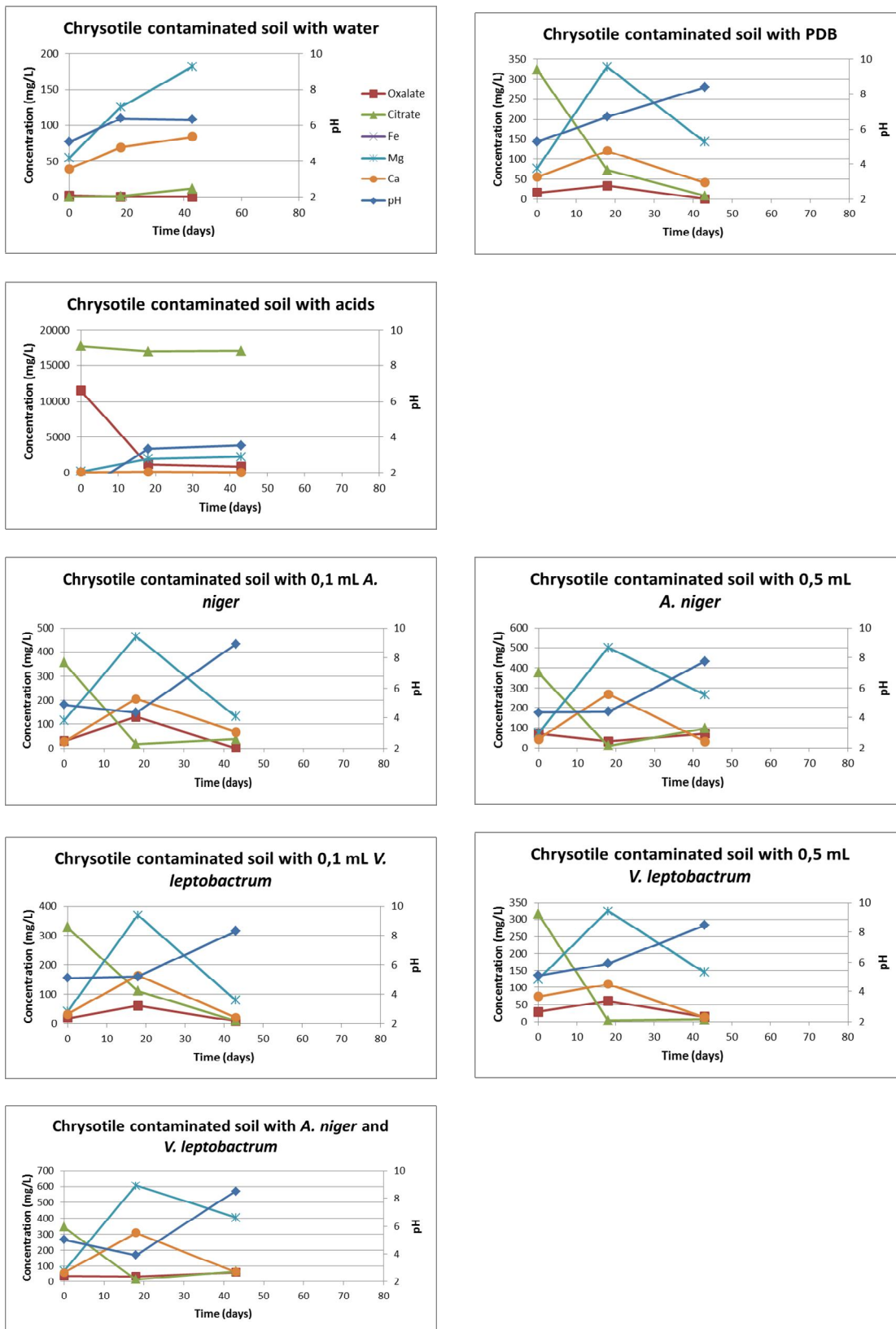


Figure 4.39 Asbestafbraak in asbest/grond.

5 Ontwerp van een veldpilot

6 Conclusies

Uit het eerdere asbestonderzoek bij Deltares blijkt dat asbest door schimmels en hun metabolieten kan worden afgebroken. Het grote effect van oxaalzuur werd ook gedemonstreerd, zoals ook bekend was uit de literatuur. In deze studie is verder op deze kennis voortgebouwd en zijn de relevante processen verder bestudeerd om te komen tot een proefpilot.

In dit onderzoek hebben we de beste condities bepaald om de schimmels te laten groeien en ze asbest af te laten breken. Door te werken met PDB (Potato Dextrose Broth) medium, is deze afbraak verbeterd en wordt de groei van schimmels verhoogd en versneld. *A. niger* had de hoogste asbestafbraakactiviteit in vergelijking met de andere bestudeerde schimmels. Deze activiteit wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door de hoge productie van zuren, waarvan oxaalzuur het sterkst degraderende effect lijkt te hebben. Er werd ook aangetoond dat beweging (rollen) de groei van schimmels bevordert en een positief effect heeft op de asbestdegradatie.

Na deze studie moeten verschillende experimenten worden uitgevoerd. Asbestcementafbraak moet onder dezelfde omstandigheden als het experiment met flesjes en chrysotiel worden bestudeerd. Op deze manier worden de beste omstandigheden voor de asbestcementafbraak gedemonstreerd. Pilot proeven kunnen dan worden uitgevoerd met behulp van cementmixers onder de stop-and-go toestand (1 uur draaien voor 5 uur stoppen). Daarbij kan het effect van de twee schimmels en citroen- en oxaalzuur op chrysotiel besmette grond en asbestcement op grote schaal bestudeerd.

Referenties

1. Tempelman et al., 2004, Risicogerichte classificatie van werkzaamheden met asbest.
3. Schinkel, J., en Den Boeft, K., 2013, Innovatieve saneringsmethoden in de asbestbranche. PPT presentatie.
4. Tempelman, 2016, Presentatie 'Asbestdaken: knelpunten en oplossingen'.
5. Tromp, Tempelman, 1998, Ontwikkeling van een methode voor de bepaling van asbest in afval en puingranulaat (concept NEN 5897)
6. Wayne Berman, 2000, Modified elutriator method for the determination of asbestos in soils and bulk material.
7. R.E. Lapperre, 1997, Asbest in de bodem: (G)een probleem? Bodem, nummer 2, 1997.
8. Register, 2006, Asbest in kaart, Historisch onderzoek asbestgebruik methode Asbestkansenkaart.
9. Tempelman et al., 2013, Onderzoek naar de blootstelling aan asbest tijdens saneringswerkzaamheden. TNO 2013 R11850.
10. Geofox, 2014, Bijzonder inventariserend onderzoek; Erosie van asbestdaken.
11. Tromp, 2002, Oriënterende studie naar blootstellingsrisico's door met asbest verontreinigde bodem. TNO rapport R 2002/078.
12. RIVM rapport 'Beoordeling van de risico's van bodemverontreiniging met asbest' (711701034/2003, RIVM, TNO, Grontmij).
13. Gadikota et al., 2014, Morphological changes during enhanced carbonation of asbestos containing material and its comparison to magnesium silicate minerals. Journal of hazardous materials, vol. 264, p. 42-52.
14. Lavkulich, 2014, Effects of natural acids on surface properties of asbestos minerals and kaolinite. Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering. Vol. 49, p617-24.
15. Lee, J., 2015, Optimal Treatment Condition for Changing Characteristics of Naturally Occurring Asbestos. Aerosol and air quality research. Vol. 15, p 2332-2345.
16. Rozalen et al., 2014, Effect of oxalate and pH on chrysotile dissolution at 25 °C: An experimental study. American mineralogist, vol. 99, p. 589-600.
17. Rozalen & Huertas, 2013, Comparative effect of chrysotile leaching in nitric, sulfuric and oxalic acids at room temperature. Chemical geology, vol. 352, p. 134-142.
18. Turci et al., 2010, New detoxification processes for asbestos fibers in the environment. Journal of toxicology and environmental health. Part A. Vol. 73, p. 368-377.
19. Turci et al., 2007, The combination of oxalic acid with power ultrasound fully degrades chrysotile asbestos fibres. Journal of environmental monitoring. Vol 9, p 1064-1066.
20. Turci et al., 2008, A new approach to the decontamination of asbestos-polluted waters by treatment with oxalic acid under power ultrasound. Ultrasonics sonochemistry. Vol. 15, p. 420-427.
21. Valouma et al., 2015, Chrysotile asbestos detoxification with a combined treatment of oxalic acid and silicates producing amorphous silica and biomaterial. Journal of hazardous materials. Vol. 305, p. 164-170.
22. Holmers, E.P., 2014, The effects of naturally occurring acids on the surface properties of chrysotile asbestos. Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering. Vol. 49, p 1445-52.
23. Tempelman et al., 2004, Risicogerichte classificatie van werkzaamheden met asbest, TNO rapport R2004/523.

24. Turick & Berry, 2016, Review of concrete biodeterioration in relation to nuclear waste. *J. Env. Radioactivity*. Vol. 151, p. 12-21.
25. Wei et al., 2013, Microbiologically induced deterioration of concrete – A review. *Braz. J. Microbiology*, 44, p. 1001-1007.
26. Martino et al 2004, Physical and biochemical interactions of soil fungi with asbestos fibers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4):938–944.
27. Daghino 2006, Soil Fungi Reduce the Iron Content and the DNA Damaging Effects of Asbestos Fibers. *Environ. Sci. Technol.* 40:5793 - 5798
28. Daghino 2008, Bioweathering of chrysotile by fungi isolated in ophiolitic sites. *FEMS Microbiol Lett* 285:242–249.
29. Daghino 2009, Weathering of chrysotile asbestos by the serpentine rock-inhabiting Fungus *Verticillium leptobactrum*. *FEMS Microbiol Ecol* 69:132–141.
30. Favero-Longo, S.E. et al., 2013, Lichen deterioration of asbestos and asbestiform minerals of serpentinite rocks in Western Alps. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84 342-350.
31. Favero-Longo et al., 2009, Lichens on asbestos–cement roofs: Bioweathering and biocovering effects. *Journal of Hazardous Materials* 162:1300–1308.
32. Favero-Longo et al., 2005, Chrysotile asbestos is progressively converted into a non-fibrous amorphous material by the chelating action of lichen metabolites. *J. Environ. Monit.*, 7: 764-766.
33. Gadd, G.M., 2010, Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156:609-643.
34. Gadd et al., 2012, Geomycology: metals, actinides and biominerals. *Env. Microbiology Reports*, vol 4, p 270-296.
35. Bhattacharya et al., 2015, Bacterial weathering of asbestos, *Silicon*, 7, p. 419-431.
36. Gadd, 2004, Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist*, Vol. 18, p. 60.
37. Gadd, 2007, Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*. Volume 111, Issue 1, January 2007, Pages 3–49.
38. Ceci et al., 2015, Fungal Bioweathering of Mimetite and a General Geomycological Model for Lead Apatite Mineral Biotransformations. *Appl. Env Microbio.*, vol 81, p. 4955-4964.
39. McCutcheon et al., 2016, Microbially Accelerated Carbonate Mineral Precipitation as a Strategy for in Situ Carbon Sequestration and Rehabilitation of Asbestos Mine Sites. *Env. Sci. Tech.*, vol 50, p. 1419-1427.
40. Ehrlich, 1996, *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong.
41. TNO, 2007, Oriënterend onderzoek naar de verspreiding van asbestvezels in het milieu vanuit verweerde asbestcement daken. *TNO Rapport TR 2007/420*.
42. Colangelo et al., 2011, Treatment and recycling of asbestos cement containing waste.
43. Plescia et al., 2003, Mechanochemical treatment to recycling asbestos containing waste.
44. Schwyn en Neilands (1987)