



Een onderzoeksproject, uitgevoerd aan de Vrije Universiteit, Universiteit van Amsterdam, en Wageningen Universiteit, heeft geleid tot een sterk verbeterd inzicht in biologische processen die van belang zijn bij de afbraak van belangrijke grondwaterverontreinigingen, zoals oliecomponenten en gechlloreerde afvalproducten van waterrijen. De resultaten zijn van belang voor bodembescherming en de beoordeling van de natuurlijke afbraak van vervuiling.

Grondwater is een belangrijke bron van drinkwater in Nederland. Daarnaast worden rivieren en natuurgebieden gevoed door opwellend grondwater. Veel grondwater is vervuild, vooral met relatief goed-oplosbare organische stoffen zoals oliecomponenten en gechlloreerde koolwaterstoffen. Dit beperkt het gebruik van grondwater en levert mogelijk gevaar op voor mens en natuur. In totaal zijn er naar schatting in Nederland zo'n 600,000 vervuilde locaties. Het actief opruimen of vastleggen van die vervuiling zou de Nederlandse maatschappij vele miljarden kunnen kosten. Echter, in het verleden is gebleken dat de ondergrond, daar waar het grondwater zich bevindt, vaak een natuurlijk vermogen bezit om met name organische verontreinigingen af te breken of vast te leggen. Als dit proces maar voldoende snel verloopt, zou het bij veel verontreinigde locaties niet nodig zijn om in te grijpen: men zou kunnen vertrouwen op de natuurlijke processen, tegen aanzienlijk lagere kosten. Om daadwerkelijk te vertrouwen op natuurlijke afbraak is het belangrijk om inzicht te hebben in welke processen nu belangrijk zijn in die natuurlijke afbraak en hoe men die belangrijke processen zou kunnen meten.

Het doel van deze studie was het in kaart brengen van natuurlijke afbraakprocessen met nadruk op de afbraak onder zuurstofloze omstandigheden van monoaromatische oliecomponenten (dit zijn oliecomponenten bestaande uit moleculen met een enkele ringvorm, zoals benzeen, toluen, ethylbenzeen en xyleen) en gechlloreerde koolwaterstoffen, belangrijke verontreinigingen in Nederland. Veel grondwater in Nederland is zuurstofloos, en de twee genoemde types van verontreiniging hebben een verschillende functie voor microorganismen: monoaromatische

oliecomponenten zijn elektronendonoren (vergelijkbaar met de functie van voedsel voor mensen) en gechlorideerde koolwaterstoffen zijn elektronenacceptoren (vergelijkbaar met de functie van zuurstof voor mensen). Het onderzoek is gedaan in een multidisciplinaire samenwerking tussen de drie bovengenoemde universiteiten, waarbij ecologie, microbiologie, milieuchemie en statistiek zijn gecombineerd. In de biologie heeft de toepassing van zgn. moleculaire technieken de laatste jaren een sterke vlucht genomen. Deze technieken richten zich vooral op het specifiek waarnemen van een stukje erfelijke informatie (DNA), of het expressie-product ervan (mRNA), en het slim en snel vermenigvuldigen van die specifieke informatie met de zgn. PCR reactie. Deze aanpak stond ook centraal in dit project, maar werd gecombineerd met conventionele cultivatie van microorganismen en nieuwe technieken zoals labelen van vetzuren met zware isotopen, isotoop fraktionatie en het meten van tussenstoffen in de afbraak, om het inzicht in de afbraak van vervuiling te verhogen.

Drie onderzoekslocaties zijn in detail onderzocht, met de meeste aandacht voor het ondergronds gebied stroomafwaarts van de Banisveld vuilstort, Boxtel, Noord-Brabant. Stroomafwaarts van deze vuilstort ligt een belangrijk nutriënt-arm natuurgebied, de Kampina. De structuur van de levensgemeenschappen in de ondergrond bleek vrij simpel, er zijn veel soorten bacteriën aanwezig terwijl het aantal eencellige organismen dat zich zou kunnen voeden op de bacteriën, zoals protozoa, gering is. Grotere organismen, zoals kleine kreeftachtigen die in sommige gevallen het grondwater bevolken, waren hier afwezig. Over relatieve korte afstanden (meter schaal) bleken er grote variatie tussen monsters te zijn qua aanwezigheid van soorten. Deze heterogeniteit in de samenstelling van levensgemeenschappen draagt bij tot de algemene biodiversiteit bij de onderzoekslocatie en zou voordelig kunnen zijn in de natuurlijke afbraak zijn, omdat tijdens zijn loop door de ondergrond het grondwater, met daarin de verontreiniging, een grotere kans zou hebben de juiste omstandigheden en microorganismen tegen te komen die bijdragen aan de afbraak. Behalve een grote ruimtelijke heterogeniteit, werd ook een grote dynamiek in microbiële gemeenschappen over een periode van 6 jaar waargenomen.

Ook de zuurstofloze afbraak van monoaromatische koolwaterstoffen, met ijzer als electronenacceptor is onderzocht voor de Banisveld locatie. De biodegradatie in vervuilde en schone referentie punten werd bepaald om het effect van eerdere blootstelling aan monoaromatische koolwaterstoffen op microbiële gemeenschappen en hun vermogen om die vervuiling af te breken, te achterhalen. We waren de eerste om aan te tonen dat p-xyleen kan worden afgebroken onder ijzerreducerende condities. In dit onderzoek was de toepassing van isotopen belangrijk. Vervuilingscomponenten, zoals toluen, gelabeld met zware isotopen werden gebruikt om te achterhalen welke organismen die stoffen omzetten en hoe zij dat doen, doordat het label werd ingebouwd in de biomassa, vooral in vetzuren, maar ook in afbraakproducten. Deze gelabelde vetzuren en afbraakproducten werden vervolgens specifiek

gedetecteerd en uit het type gelabelde vetzuur werd afgeleid welk soort het was. Deze analyses als ook de moleculaire karakterisatie, suggereren een rol van *Geobacter* in de afbraak. Daarnaast werd de eigenschap van microorganismen om vooral vervuiling die relatief veel lichte isotopen bevat, op te eten, gebruikt om te achterhalen hoe de biologische afbraak van vervuiling bij Banisveld, op basis van veranderingen in de ratio licht en zware isotopen verloopt met de afstand van de vuilstort (isotoop fractionatie).

Het tweede type vervuiling dat werd onderzocht waren de gechloreerde koolwaterstoffen. Moleculaire methoden werden ontwikkeld om het afbraakpotentiaal van microorganismen die ademen met gechloreerde alifaten (anaërobe dehalogeneerders) te evalueren. Uniek in deze aanpak was dat we de functie van de microorganismen in hun natuurlijke omgeving onderzochten en niet zozeer op hun identiteit. Dit werd gedaan door specifiek te kijken naar een gen dat essentieel is in de ademhaling met gechloreerde koolwaterstoffen en codeert voor het enzym dehalogenase. Een methodiek voor de snelle detectie en moleculaire vermenigvuldiging via een PCR is opgezet en gevalideerd aan de hand van een aantal laboratoriumstammen die ademen met gechloreerde alkanen, en monsters uit het veld. Aantallen en activiteit van de anaërobe dehalogeneerders zijn bepaald op basis van het 16S ribosomale RNA gen dat in elke bacterie aanwezig is en wordt gebruikt om evolutionaire verwantschap tussen organismen te bepalen, en het dehalogenase-gen dat het vermogen tot afbraak van gehalogeneerde koolwaterstoffen aangeeft. Hieruit is gebleken, dat hogere aantallen aan dehalogeneerende populaties goed correleerde met een verhoogd afbraakactiviteit in zogenoemde bioschermen, waar het afbraakproces door middel van substraatinjectie in de ondergrond gestimuleerd werd.

De methodieken gebruikt en ontwikkeld in dit project kunnen bijdragen aan het voorspellen en volgen van natuurlijke afbraak bij andere vervuilde locaties en zullen bijdragen aan de management en actieve remediatie van andere vervuilde grondwater ecosystemen.

De vervuilingsspluim bij Banisveld vuilstort lijkt zich gestabiliseerd te hebben, maar er zijn ook indicaties dat de pluim in de laatste jaren meer naar het oppervlakte is gekomen. Een systeem van extensieve monitoring lijkt gewenst.

De resultaten zijn van belang voor bodembescherming en het evalueren van de natuurlijke afbraak van vervuiling:

1. Er is bewijs verkregen voor de *in situ* (ter plekke) anaërobe afbraak van monoaromatische oliecomponenten in een aantal vervuilde grondwater ecosystemen, op basis van het meten van koolstofisotoop-fractionatie en afbraakproducten in het veld en in vergelijking tot laboratoriumexperimenten.

2. Een aantal (mengsels van) bacterie-soorten die betrokken zijn bij de afbraak van belangrijke verontreinigingen zijn geïdentificeerd en gekarakteriseerd. De aanwezigheid van deze soorten kunnen worden gemeten bij andere locaties.
3. Met behulp van nieuw ontwikkelde, zogenaamde moleculaire methodes, is het nu mogelijk de hoeveelheden en activiteiten van bacteriën betrokken bij biodegradatie te bepalen op basis van functionele markers (genen betrokken bij de afbraak). Dit maakt het mogelijk om bioremediatie processen *in situ* te bestuderen en kennis te verkrijgen over wat de belangrijke factoren zijn die een gewenst proces (bv. afbraak) beïnvloeden.
4. Mathematische modellen, gecombineerd met Ecologische Controle Analyse, kunnen bijdragen tot nieuwe inzichten in het functioneren van het grondwaterecosysteem. Het inzicht in het functioneren van het geheel systeem kan worden gebruikt om verrassende nieuwe mogelijkheden in bodembescherming en bioremediatie te ontwikkelen en te testen. Een voorbeeld daarvan is de (theoretische) mogelijkheid van toepassing van bacterie-etende protozoa om bacteriële processen te versnellen.
5. Hydrogeochemie en de samenstelling van microbiële gemeenschappen (zowel in het algemeen, als gericht op (aantallen behorende tot) een bepaalde groep) die gehecht zijn aan sediment in de ondergrond kan sterk variëren over korte afstanden (meter-schaal) en met de tijd. Dit heeft consequenties voor het nemen van monsters (het aantal monsters nodig om een vervuilde locatie goed te kunnen beschrijven). Aan de andere kant, zou de grote heterogeniteit zou grotere biodiversiteit kunnen onderhouden welke in zijn totaal beter in staat is om vervuiling af te breken.

-x-x-x-x-x-

Projecttitel: Resilience of the groundwater ecosystem in reaction to anthropogenic disturbances.
NWO-ALW-dossiernummer): 835.80.007.
Looptijd: 1 oktober 2001 - 15 oktober 2005.

Betrokken wetenschappers:

I: Vrije Universiteit Amsterdam

Traian Brad, promovendus

Molecular Cell Physiology, Faculty of Earth and Life Sciences,
Vrije Universiteit Amsterdam,

De Boelelaan 1085, 1081 HV Amsterdam, Nederland.

Overige betrokkenen:

Martin Braster (analist), Boris van Breukelen (adviseur hydrogeochemie),
Henk van Verseveld (supervisor tot hij t.g.v. een ongeval op 11 July 2003
overleed),

Wilfred Röling (supervisor), Nico van Straalen
(promoter/supervisor/projectleider, Dierecologie).

II: Wageningen Universiteit en Research Centrum

Meta van Heusden, promovenda

Laboratory of Microbiology, Department of Agrotechnology and Food Sciences,
Wageningen Universiteit en Research Centrum,

Hesselink van Suchtelenweg 4, 6703 CT Wageningen, Nederland.

Overige betrokkenen:

Anton Akkermans (supervisor tot december 2002), Willem de Vos (promoter),
Hauke Smidt (supervisor).

III: Universiteit van Amsterdam

Sabrina Botton, promovenda

Earth Surface Processes and Materials, IBED,

Universiteit van Amsterdam,

Nieuwe Achtergracht 166 1018 WV Amsterdam, Nederland.

Overige betrokkenen:

John Parsons (supervisor).