

DNA-bewijs CKW-dechlorering (PT 7431)

Kwantitatieve specifieke DNA-detectie als bewijs voor volledige dechlorering van chloorkoolwaterstoffen

Definitief

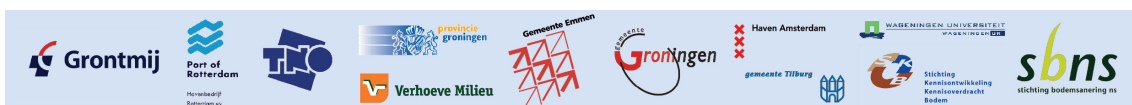
S.K.B
Postbus 420
2800 AK Gouda

JTRUIJ/rd

Grontmij Nederland bv
Assen, 16 juli 2009



242326, revisie 01



Verantwoording

Titel : DNA-bewijs CKW-dechlorering (PT 7431)

Subtitel : Kwantitatieve specifieke DNA-detectie als bewijs voor volledige dechlorering van chloorkoolwaterstoffen

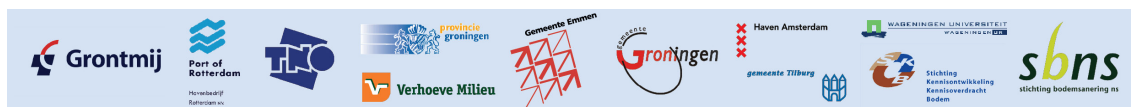
Projectnummer : 242326

Referentienummer : 242326

Revisie : 01

Datum : 16 juli 2009

Uitvoerende organisaties (consortium)



Grontmij Nederland bv : de heer ing. J.W.J. Truijen
Postbus 29, 9400 AA Assen

Port of Rotterdam :

TNO : de heer ir. N. Hoekstra

Provincie Groningen : mevrouw A. Bekkering

Verhoeve Milieu : de heer A.M. Scheffer

Gemeente Emmen : de heer W. Bijsterbosch

Gemeente Groningen : de heer J. Kootstra

Gemeente Tilburg : de heer F. Schultink

Wageningen Universiteit : de heer H. Smidt

Havenbedrijf Amsterdam : de heer R. Barkhuis

S.K.B. : de heren A. Peekel en L.M.M. Bakker

S.B.N.S. : de heer J. van Leeuwen

Autorisatie

Auteur(s) : de heren ir. N. Hoekstra, J. Gerritse, B. van der Zaan-TNO/Deltares, Postbus 80015, 3508 TA Utrecht
de heer ing. J.W.J. Truijen-Grontmij Nederland bv

E-mail adres : jan.truijen@grontmij.nl

Gecontroleerd door : de heer ing. J.W.J. Truijen

Goedgekeurd door : de heer drs. R.F.M. Onck

Inhoudsopgave

0	Samenvatting	5
1	Inleiding	6
2	Achtergrondinformatie.....	7
2.1	Problematiek CKW-verontreinigingen.....	7
2.2	Omzettingsproces	7
2.3	Dehalococoides.....	8
2.4	Specifieke enzymen.....	12
2.5	Analysemethode	12
3	Doelstelling en toepassing	14
4	Uitgevoerde werkzaamheden en resultaten	16
4.1	Eerste primerontwerp.....	16
4.2	Monsternemingen	17
4.3	Eerste fase tests	18
4.4	Uitvoering PCR's.....	19
4.5	Uitwerking data	19
5	Interpretatie resultaten proeflocaties	21
5.1	Algemeen	21
5.2	Locatie Groningen.....	21
5.2.1	Beschrijving.....	21
5.2.2	Evaluatie	22
5.3	Locatie Nieuw-Weerdinge.....	23
5.3.1	Beschrijving.....	23
5.3.2	Evaluatie	24
5.4	Locatie Amsterdam	25
5.4.1	Beschrijving.....	25
5.4.2	Evaluatie	26
5.5	Locaties gemeente Tilburg.....	27
5.5.1	Beschrijving.....	27
5.5.2	Evaluatie	28
5.6	Spoorlocatie Tilburg SBNS	29
5.6.1	Beschrijving.....	29
5.6.2	Evaluatie	30
5.7	Locatie Oldenzaal	30
5.7.1	Beschrijving.....	30
5.7.2	Evaluatie	31
5.8	Locaties Rotterdam.....	33
5.8.1	Beschrijving.....	33
5.8.2	Evaluatie	33
5.9	Advies voor vervolg.....	35

6	Discussie: evaluatie bruikbaarheid analyse op VC-reductases.....	37
6.1	Multivariabele statistische analyse	37
6.2	Volledigheid van de analyse	38
6.3	Toegevoegde waarde ten opzichte van chemische indicatoren.....	39
6.4	Toegevoegde waarde ten opzichte van biologische indicatoren	39
6.5	Toepassingswijze.....	40
6.6	Betrouwbaarheid van de analyse	40
6.7	Nadere discussie	41
7	Conclusies en aanbevelingen.....	42

Bijlage 1: Analysegegevens

0 Samenvatting

Bij veel chemische waterrijen en metaalbedrijven is, door gebruik van chemische was- en ontvettingsmiddelen, de bodem verontreinigt geraakt met chloorkoolwaterstoffen (CKW's). Hoge kosten voor bodemsanering kunnen worden beperkt door gebruik te maken van biologische afbraak. In Nederlandse bodems zijn de condities dikwijls gunstig voor gedeeltelijke afbraak van CKW's, waarbij een deel van de chlooratomen wordt verwijderd. Helaas blijft vaak vinylchloride (VC) aanwezig omdat de chemische en biologische bodemcondities op veel plaatsen – en vooral in watervoerende lagen – juist niet gunstig zijn om het laatste chlooratoom biologisch te verwijderen. VC is in grondwater mobieler, vluchtiger en meer toxisch dan de CKW's waaruit deze stof gevormd wordt, zodat grote verontreinigingspluimen ontstaan met mogelijke risico's voor mens en milieu.

Om goed te kunnen bepalen in hoeverre verontreinigingen daadwerkelijk problematisch zijn en zo nodig efficiënte saneringsmaatregelen te ontwerpen en rendabel uit te voeren (met optimaal gebruik van de biologie), moet eenduidig worden vastgesteld of de specifieke capaciteit om anaeroob VC te dechloreren in de verontreinigde bodemlagen aanwezig is. Sinds kort is dat in principe mogelijk door het verzamelen van genetische informatie. Recentelijk zijn genen in kaart gebracht, waarmee enkele enzymen worden aangemaakt die micro-organismen gebruiken voor de omzetting van VC naar het niet-gechloreerde etheen: zogenaamde VC-reductases. In dit project zijn testen op grondwatermonsters van diverse verontreinigde locaties uitgevoerd om te onderzoeken of detectie van VC-reductasegenen geschikt is als bewijs dat het vermogen om chloorethenen volledig te dechloreren ter plaatse aanwezig is. Ten behoeve hiervan is onderzocht of met de bestaande genetische informatie inderdaad alle relevante VC-reductasegenen kunnen worden geanalyseerd of dat mogelijk nog onbekende genen een rol spelen. Tevens is onderzocht of een combinatiemethode om meerdere VC-reductasegenen in één analyse te detecteren mogelijk is om de analysekosten te reduceren.

Uit de resultaten van dit project blijkt de nieuwe detectiemethode zeer nuttig te zijn doordat het bestaan van het vermogen in bodemzones om VC af te breken tot etheen op een 7-tal proeflocaties duidelijker kon worden aangetoond dan alleen met het bestaande pallet aan gebruikelijke karakterisatie- en monitoringsparameters, zoals redoxparameters, omzettingproducten, *Dehaloocoides*concentraties en EPA-score. Ten behoeve van de bij dit project behorende wetenschappelijke publicatie is dit aantal nog uitgebreid met 4 aanvullende proeflocaties. Omdat de resultaten op de onderzochte locaties er tevens op wijzen dat behalve de geteste VC-reductasegenen *vcrA* en *bvcA* geen andere, onbekende VC-reductases relevant zijn voor VC-dechlorering, volstaat in principe analyse op deze afzonderlijke genen. Beide zijn van belang omdat soms slechts één van de twee voorkomt. Een totaalanalyse van VC-reductases is succesvol ontwikkeld, maar aangezien geen andere VC-reductasegenen zijn gevonden en de detectiegrens hiervan hoger is, is de toegevoegde waarde beperkt. Nochtans kan deze nieuw ontwikkelde DNA-detectiemethode nuttig zijn bij grote aantallen te analyseren monsters en relatief hoge te verwachten genenconcentraties, zoals bij sturing van biologische saneringen op basis van procesmonitoring.

1 Inleiding

Chloorkoolwaterstoffen (CKW's) kunnen in de bodem biologisch worden afgebroken, maar in de praktijk blijkt op verontreinigde locaties vaak moeilijk aan te tonen dat volledige natuurlijke afbraak (NA) tot niet-gechloreerde eindproducten op alle relevante terreindelen en in de verschillende bodemlagen daadwerkelijk plaatsvindt. Dit heeft tot gevolg dat bij bodemsanering tot nu toe vaak onterecht niet, onvoldoende, of inefficiënt gebruik wordt gemaakt van (gestimuleerde) natuurlijk afbraak. Doel van dit project is het verkrijgen van een betrouwbare methode die voor met CKW's verontreinigde locaties het bewijs kan leveren dat het vermogen om chloorethenen volledig te dechloreren ter plaatse in de bodem aanwezig is.

Dit project omvat het valideren, testen en demonstreren op proeflocaties van de kwantitatieve detectie van DNA voor het sleutelenzym vinylchloride(VC)-reductase. Dit enzym is recentelijk geïdentificeerd in enkele stammen van de bacterie *Dehalococcoides*. Met deze detectiemethode kan capaciteit voor volledige dechlorering worden aangetoond. Tevens beoogt dit project het ontwikkelen van één algemeen toepasbare detectiemethode voor VC-reductasegenen, op basis van aanvullend DNA-onderzoek. Deze algemene detectiemethode is eveneens op de proeflocaties gevalideerd, getest en gedemonstreerd.

Beoogd resultaat is een breed toepasbare methode waarmee capaciteit voor volledige dechlorering in met chloorethenen verontreinigde bodems kan worden aangetoond. Er wordt naar gestreefd om na de demonstratie te beschikken over een routinematig toe te passen techniek met een kostprijs tussen € 200,- en € 300,- per monster. De techniek zal worden uitgevoerd door specialistische laboratoria en toegepast door milieukundig adviseurs en gespecialiseerde aannemers.

In hoofdstuk 2 wordt eerst de theoretische achtergrondinformatie behandeld met omzettingsprocessen, betrokken organismen, verantwoordelijke enzymen en detectiemethode. Vervolgens worden in hoofdstuk 3 de doelstelling en de toekomstige toepassingsmogelijkheden van de uitkomsten van dit project gepresenteerd. Hoofdstuk 4 beschrijft de uitgevoerde werkzaamheden en de resultaten. De concrete interpretatie voor de in dit project ingebrachte cases staat in hoofdstuk 5. Laatstgenoemde beide hoofdstukken vormen de basis voor een evaluatie van de nieuwe detectiemethode in hoofdstuk 6. In hoofdstuk 7, tenslotte, zijn de conclusies en aanbevelingen geformuleerd.

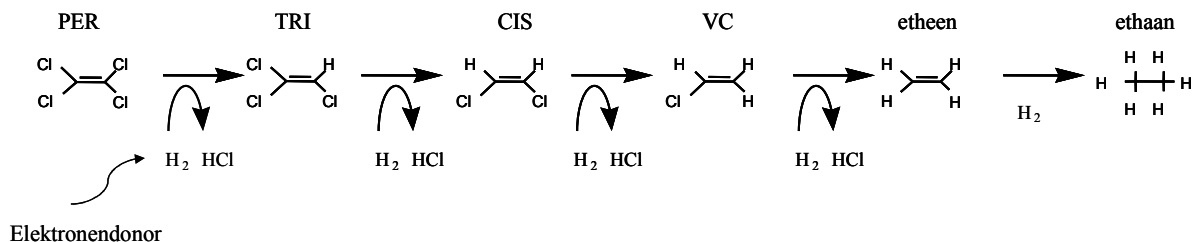
2 Achtergrondinformatie

2.1 Problematiek CKW-verontreinigingen

De problematiek van met CKW's verontreinigde bodems is op diverse plaatsen al uitgebreid beschreven en wordt hier daarom niet herhaald. Voor een volledig overzicht wordt verwezen naar het SKB-cahier 'VOCL: Vluchtige chloorkoolwaterstoffen (VOCL) in bodem' (SKB, februari 2007). In dit hoofdstuk wordt expliciet ingegaan op een aantal aspecten van de problematiek die specifiek betrekking hebben op de afbraak van vinylchloride.

2.2 Omzettingsproces

Tetrachlooretheen (PER) en trichlooretheen (TRI) kunnen onder bepaalde omstandigheden via het proces van reductieve dechlorering, biologisch via cis-1,2-dichlooretheen (CIS) en vinylchloride (VC) worden omgezet in de niet-gechloreerde koolwaterstoffen etheen en ethaan; hierbij fungeren deze CKW's als elektronenacceptor (figuur 2.1).



Figuur 2.1 - reductieve dechlorering van PER

Voor dit proces zijn anaerobe (bij voorkeur methanogene) redox-omstandigheden in de bodem nodig, voldoende geschikte organische stof die als elektronendonator kan dienen en uiteraard de organismen die de gewenste omzettingen kunnen verrichten. Op veel locaties wordt aan deze voorwaarden niet of slechts plaatselijk - bijvoorbeeld in bepaalde lagen met voldoende organische stof - voldaan. Door het toedienen van elektronendonator kunnen vaak de vereiste redox-omstandigheden worden gecreëerd en krijgen de benodigde micro-organismen (indien die op deze specifieke plaatsen aanwezig zijn) de kans zich te vermenigvuldigen.

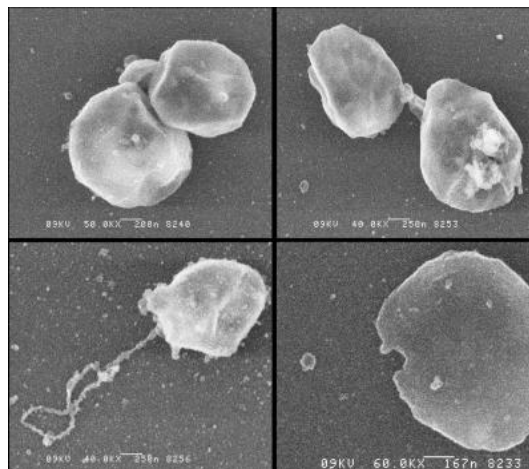
Om te bepalen of op een locatie de juiste omstandigheden in de bodem aanwezig zijn, worden doorgaans geochemie, redox-parameters en de aanwezigheid van organische stoffen in kaart gebracht. Hiermee wordt echter alleen aangetoond dat biologische afbraak via reductieve dechlorering in principe mogelijk is; niet dat deze ook daadwerkelijk plaatsvindt. Een concentratie-toename van omzettingsproducten zou in principe wel een direct bewijs moeten kunnen opleveren dat biologische afbraak plaatsvindt. Voor het aantonen van volledige afbraak is het dan noodzakelijk een toename aan te tonen, in de tijd of langs een stroombaan, van de concentraties van de niet-gechloreerde eindproducten van de reductieve dechlorering, etheen en ethaan.

In de praktijk zijn echter lang niet altijd eenduidige conclusies te trekken, omdat:

- deze stoffen tevens via biotransformaties uit andere organische stoffen in de bodem kunnen ontstaan en ze zelf ook weer onderhevig zijn aan afbraak;
- de afbraakproducten in het verleden al kunnen zijn gevormd zodat geen bewijs wordt geleverd dat het dechloreringsproces op het moment van monstername daadwerkelijk nog optreedt;
- transport van stoffen met de grondwaterstroming in de bodem leidt tot een toename van omzettingsproducten stroomafwaarts. Omdat de omzettingen al stroomopwaarts kunnen hebben plaatsgevonden, kan niet zomaar worden geconcludeerd dat op een bepaald terreindeel in een bepaalde laag biologische afbraak optreedt.

2.3 Dehalococcoides

Aanvullende aanwijzingen voor het optreden van biologische afbraak van chloorethenen kunnen worden verkregen door het aantonen van de aanwezigheid van de organismen die de gewenste omzettingen uitvoeren. *Dehalococcoides* bacteriën (zie figuur 2.2) zijn de enige micro-organismen waarvan bekend is dat ze de volledige dechlorering van PER en TRI kunnen uitvoeren.



Figuur 2.2 - *dehalococcoides*, foto gemaakt met SEM (scanning elektron micrograph), 25.000 x uitvergroot

Het DNA van een aantal *Dehalococcoides*-stammen is gekarakteriseerd en inmiddels zijn methoden ontwikkeld om specifieke genen aan te tonen en te kwantificeren (zie figuur 2.3 voor een schematische weergave).

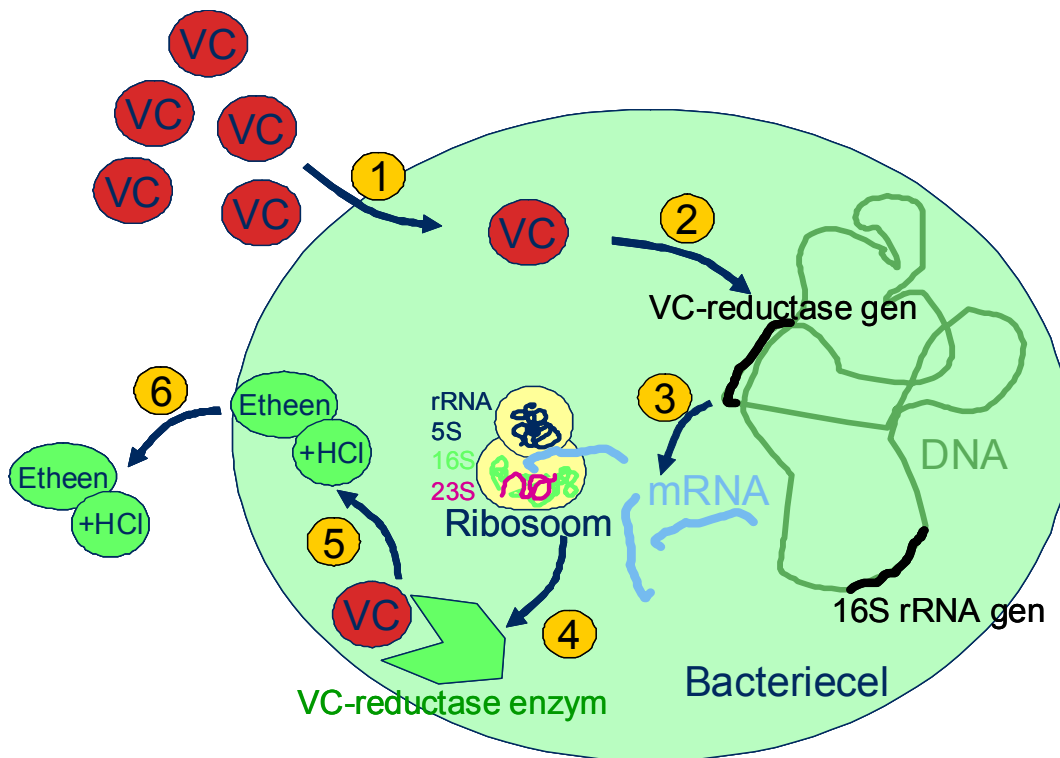
Intermezzo: Hoe zat het ook al weer met DNA, RNA en genen

DNA of voluit Desoxyribonucleïnezuur is de belangrijkste drager van erfelijke informatie. Een DNA-molecuul bestaat uit twee lange strengen van vier verschillende nucleotiden, die aan elkaar verbonden zijn door baseparen en samen een dubbele helix vormen. Een aantal nucleotiden achter elkaar in één van de vele denkbare volgordes – een sequentie - vormen een gen dat een bepaalde erfelijke eigenschap bevat. Bij celdeling splitsen en verdubbelen de beide strengen zich.

Bij hogere organismen bevinden de DNA-moleculen zich in eiwitstructuren in de celkernen: chromosomen. Bacteriën hebben chromosomen 'los' in de cel maar bezitten ook vaak kleinere DNA-fragmenten: plasmiden. Plasmiden kunnen relatief eenvoudig worden uitgewisseld tussen verschillende soorten eencellige organismen, waarmee erfelijke eigenschappen worden overgedragen.

Eén gen bevat over het algemeen de instructies voor het synthetiseren van één bepaald eiwit, bestaande uit aminozuren, waarmee erfelijke eigenschappen tot expressie worden gebracht. Dat gebeurt door de genetische informatie die is opgeslagen in het DNA met behulp van RNA te vertalen naar aminozuurvolgordes in eiwitten. RNA komt in verschillende vormen voor. Zogenaamd mRNA (boodschapper-RNA) brengt de genetische informatie van de celkern naar de ribosomen: de eiwitfabrieken van de cel, opgebouwd uit rRNA (ribosomaal RNA). De aminozuren die nodig zijn om de benodigde eiwitten te fabriceren, worden naar de ribosomen gebracht door tRNA (overdrachts-RNA).

De vervaardigde eiwitten vervullen binnen en buiten de cel een enorme verscheidenheid aan biologische functies.



Figuur 2.3 Schematische weergave van het genetisch materiaal dat relevant is voor reductieve dechlorering van chloorethenen: het 16S rRNA-gen en het VC-reductasegen (zie § 2.3). De stappen die worden doorlopen bij afbraak van vinylchloride zijn eveneens schematisch weergegeven: opname (1) van VC in de cel induceert (2) de transcriptie (3) van een VC-reductasegen naar mRNA dat in een ribosoom leidt tot de productie (4) van een VC-reductase-enzym waarmee VC wordt afgebroken (5) tot etheen dat vervolgens wordt uitgescheiden (6).

Bacteriën kunnen worden geïdentificeerd aan de hand van het soortspecifieke 16S rRNA-gen. De detectie van *Dehalococcoides* specifieke 16S rRNA genen in bodem- en grondwatermonsters wordt vaak gezien als bewijs dat volledige dechlorering optreedt. Echter, momenteel zijn DNA 16S rRNA genen van meer dan 100 *Dehalococcoides*-stammen bekend, waarvan maar een deel in staat is tot volledige dechlorering van chloorethenen (www.genbank.org). Zo is bijvoorbeeld *Dehalococcoides* sp. stam VS in staat CIS en VC om te zetten, *Dehalococcoides* sp. stam CBDB1 PER en TRI en *Dehalococcoides* sp. stam FL2 PER, TRI en CIS. *Dehalococcoides ethenogenes* stam 195 kan de hele hierboven weergegeven omzettingssreeks uitvoeren, maar VC-dechlorering door dit organisme is een traag cometabolisch proces. *Dehalococcoides* sp. stam BAV1 is in staat te groeien met alle DCE isomeren en VC als elektronenacceptor, maar bij dit organisme is juist de PER- en TRI-dechlorering traag. In tabel 2.1 is voor bovengenoemde en enkele verwante organismen een overzicht gegeven van dechloreringsmogelijkheden.

Tabel 2.1 - reductieve dechlorering van chloorethenen en andere stoffen door enkele *Dehalococcoides* stammen

Organisme	PER	TRI	CIS	VC	Andere gedechloreerde stoffen
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> stam 195	+	+	++	Co	1,2-DCA, 1,2-dibroomethaan, Chloorbenzenen, Chloordibenzodioxines, Chloordibenzofuranen, PCB's, Chloronaphtalenen
<i>Dehalococcoides</i> sp. stam FL2	Co	+	+	Co	
<i>Dehalococcoides</i> sp. stam BAV1	Co	Co	+++	+	Vinylbromide, 1,2-dichlorethaan
<i>Dehalococcoides</i> sp. stam DF-1	+	+	++	?	PCB's, Chloorbenzenen
<i>Dehalococcoides</i> sp. stam VS	-	+	++	+	
<i>Dehalococcoides</i> sp. stam CBDB1	Co	Co	-	-	Chloorbenzenen
Mengcultuur met o.a. <i>Dehalococcoides</i> KB-1	+	+	+	+	
<i>Dehalococcoides</i> sp. stam GT	-	+	+	+	

- Co = cometabole dechlorering
 - = geen dechlorering
 + = metabole reductieve dechlorering (dehalo-respiratie)
 ++ = twee CIS isomeren
 +++ = alle drie CIS isomeren

Het is bekend dat nog ook andere micro-organismen tot (delen van) de gewenste omzettingen in staat zijn, zoals *Desulfomonile*, *Dehalobacter*, *Desulfomonas*, *Sulfurospirillum* en *Desulfobacterium* stammen. Daarbij komt een onbekend aantal nog niet geïdentificeerde organismen. In verband met de nog relatief hoge prijs van DNA-analyses wordt voor het aantonen van biologische afbraak meestal uitsluitend op *Dehalococcoides* geanalyseerd.

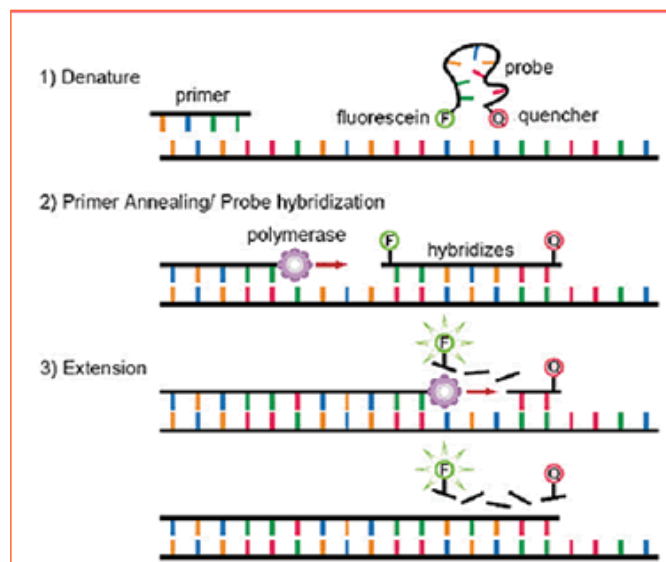
Echter, als op een locatie *Dehalococcoides* wordt aangetoond, biedt dat geen garantie dat chloorkoolwaterstoffen door biologische omzettingen uit de bodem verdwijnen, omdat deze organismen niet actief hoeven te zijn. Als bijvoorbeeld alleen *D. ethenogenes* aanwezig zou zijn, bestaat het gevaar dat VC zich ophoopt. Aangezien VC mobieler en vluchtiger is dan de uitgangproducten kan de omzetting dan juist grotere risico's veroorzaken. Anderzijds, als op een locatie *Dehalococcoides* niet wordt aangetroffen, is volledige biologische afbraak nog niet uit te sluiten, want reductieve dechlorering kan ook worden uitgevoerd door (een consortium van) andere organismen. Kwantitatieve DNA-detectie van *Dehalococcoides* en een ruimtelijke interpretatie van geochemische parameters kunnen gezamenlijk aanwijzingen opleveren voor biologische afbraak. Sluitend bewijs van duurzame afbraak op een bepaalde plaats of in een bepaalde bodemlaag, is met de huidige stand van de techniek echter nog vrijwel niet te verkrijgen.

2.4 Specifieke enzymen

Met de voortgang van het moleculair microbiologisch onderzoek is de laatste jaren ook het DNA van diverse relevante enzymen in kaart gebracht. Hierdoor is het mogelijk nieuwe analysemethoden te ontwikkelen en toe te passen voor grond- en grondwateronderzoek. In verband met de kosten van de ontwikkeling en toepassing van dergelijke analyses, is het noodzakelijk om te focussen op de essentiële omzettingstappen. Sleutelstap in de volledige dechlorering is de omzetting van VC naar etheen. Het bijbehorende sleutelenzym (zie figuur 2.3) is VC-reductase; ook wel VC-dechlorinase genoemd. Dit enzym komt in een aantal varianten voor. Het DNA van twee varianten is inmiddels bekend: *bvcA* (uit *Dehalococcoides* stam BAV1) en *vcrA* (uit de *Dehalococcoides* stammen VS en GT). Bij aanvang van dit project was het aantal varianten waarin dit enzym voorkomt onbekend.

2.5 Analysemethode

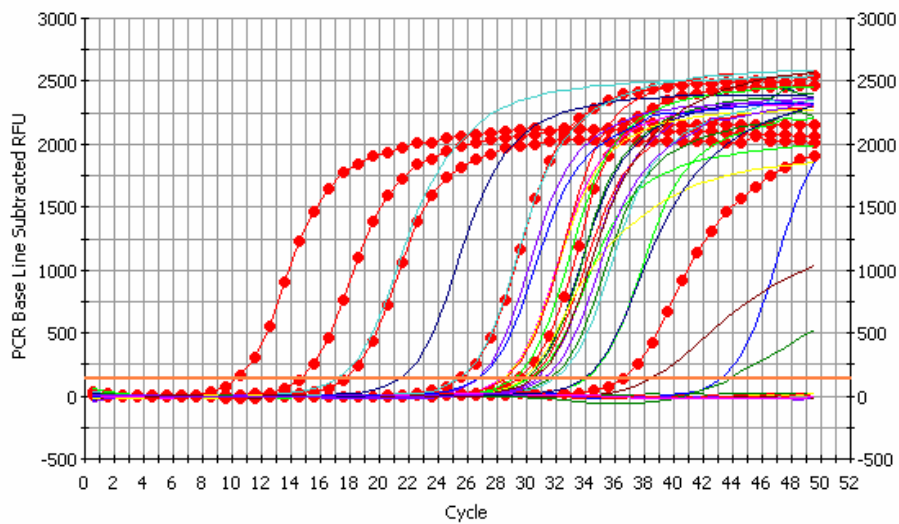
Met behulp van specifieke primers - een aantal baseparen die begin en eind van het te detecteren stuk DNA markeren - wordt het deel van de genen geamplificeerd dat karakteristiek is voor VC-reductases. De amplificatie is gebaseerd op een enzymatische reactie waarbij de DNA-strengen zich splitsen en vervolgens verdubbelen: de Polymerase Chain Reaction (PCR). Het geamplificeerde DNA kan worden gekwantificeerd door binding met een fluorescent label: de probe. Dit principe is schematisch weergegeven in figuur 2.4.



Figuur 2.4: Principe gendetectie. Het te detecteren deel van het DNA verdubbelt zich met behulp van een specifieke primer en kwantificeren is mogelijk met een probe die een fluorescent signaal afgeeft bij inbouw in het molecuul.

De analyse wordt uitgevoerd in een zogenaamd real-time PCR-apparaat (PCR= Polymerase Chain Reaction). De toename van fluorescentie wordt continu gemeten en is een maat voor de concentratie van het in het oorspronkelijke monster aanwezige VC-reductase DNA. Het apparaat wordt hierbij gekalibreerd met standaarden met bekende hoeveelheden VC-reductase-DNA.

Een voorbeeld van resultaten van een real-time PCR voor *Dehalococcoides ethenogenes* is hieronder weergegeven (figuur 2.5). Uit het aantal cycli dat nodig is voordat de fluorescentie (RFU) boven een bepaalde detectiegrens komt, wordt de concentratie DNA in het monster bepaald.



Figuur 2.5: Monstersignalen tijdens real-time PCR voor kwantificeren Dehalococcoides sp. in grondwater

3 Doelstelling en toepassing

Doelstelling is het ontwikkelen, valideren, testen en demonstreren van een methode die voor met chloorkoolwaterstoffen (CKW's) verontreinigde locaties het ondubbelzinnige bewijs kan leveren voor aanwezigheid van capaciteit voor volledige omzetting van vinylchloride (VC) tot niet-gechloreerde eindproducten. Het beoogde resultaat is een betaalbare routinematig uit te voeren kwantitatieve DNA-detectietechniek, waarmee (1) op met chloorethenen verontreinigde locaties volledige NA overtuigend kan worden aangetoond dan wel uitgesloten en tevens (2) de sturing van op stimulering van biologische omzettingen gebaseerde saneringen is te verbeteren. Een dergelijke techniek bevordert daarmee (3) de toepassing van betaalbare bodembeheer- en saneringsmaatregelen. Dat heeft onder andere weer tot gevolg dat (4) oude, vervuilde bedrijfsterreinen commercieel aantrekkelijk blijven omdat een grotere zekerheid ontstaat omtrent de werkelijke saneringskosten.

Met bestaande technologie is het mogelijk te bepalen of op een met CKW's verontreinigde locatie in de bodem biologische afbraak plaatsvindt, d.m.v. monitoring op de verschillende stoffen van de omzettingssreeks (zie figuur 2.1). Tevens is het mogelijk te bepalen of de condities in de bodem garant staan voor de duurzaamheid van dit proces, d.m.v. analyse op organische stof en redoxparameters. Bepalen of de omzetting volledig is, met andere woorden of volledige dechlorering plaatsvindt, wordt op dit moment meestal geprobeerd met behulp van analyses op niet-gechloreerde omzettingssproducten. De interpretatie daarvan wordt echter sterk bemoeilijkt door de gecompliceerdheid van het bodemsysteem, waarin de gevormde omzettingssproducten nog verder kunnen worden afgebroken, verdampen en zich verspreiden in snelheden die sterk afwijken van de uitgangskomponenten. De nieuwe DNA-techniek kan, in combinatie met een gedegen analyse van het concentratieverloop in ruimte en tijd van bovengenoemde parameters, het bewijs dat het vermogen om chloorethenen volledig te dechloreren in een bodemsegment aanwezig is wel leveren.

Het bewijs voor volledige afbraak van CKW's kan een belangrijke rol spelen in vrijwel de gehele onderzoeks- en saneringsketen:

- het nader onderzoek, als onderdeel van de risico-evaluatie. Voor een geval van ernstige bodemverontreiniging kan sanering als niet-spoedeisend worden beoordeeld als er overtuigend bewijs is dat volledige natuurlijke afbraak (NA) risico's voorkomt en uiteindelijk leidt tot een "stabiele eindsituatie" - het krimpen van de pluim - of zelfs een volledige verwijdering van de verontreiniging. In dit verband wordt opgemerkt dat gedeeltelijke afbraak de risico's juist kan doen toenemen door vorming van m.n. vinylchloride, dat mobieler, vluchtiger en toxischer is dan de uitgangsstoffen;
- In het saneringsonderzoek als beslissingsondersteunende informatie voor het kiezen van een saneringsvariant. De optimale *in situ* variant is immers de variant die het meest effectief gebruik maakt van de processen die reeds in de bodem plaatsvinden. Als NA wel volledig is, maar onvoldoende verontreinigingsvrachtverwijdering binnen een acceptabele termijn plaatsvindt, is vaak een extensieve (en kosteneffectieve) saneringsvariant mogelijk;

- bij het opstellen van het saneringsplan. De te treffen saneringsmaatregelen kunnen effectief worden ontworpen en gedimensioneerd op basis van ruimtelijke kennis over de volledigheid van de afbraak. De mate van afbraak kan namelijk door uiteenlopende omstandigheden als gevolg van de heterogeniteit van de bodem van plaats tot plaats en van laag tot laag sterk verschillen;
- bij het uitvoeren van de sanering. Tijdstippen en plaatsen voor de uitvoering van saneringsacties, zoals bijvoorbeeld elektronendonorinjecties, kunnen worden vastgesteld op basis van een analyse van de volledigheid van de afbraak in de ruimte (verontreinigingsbron, -pluim, relevante bodemlagen) en de tijd. Door het voorkómen van onnodige sanerings- en monitoringsactiviteiten wordt de efficiëntie van de saneringsuitvoering verhoogd;
- bij het afronden van de sanering. In de toekomst kunnen procesparameters worden gehanteerd als stopcriterium voor saneringen, in plaats van concentraties. Milieuhygiënisch is er geen bezwaar tegen het afronden van een sanering waarbij weliswaar nog verontreinigingen aanwezig zijn, maar overtuigend bewijs kan worden geleverd dat volledige NA risico's voorkomt en uiteindelijk leidt tot volledige verwijdering van de verontreiniging.

4 Uitgevoerde werkzaamheden en resultaten

4.1 Eerste primerontwerp

Voor het ontwikkelen van een gecombineerde analysemethode waarmee de anaerobe afbraakcapaciteit van vinylchloride (VC) door verschillende enzymen kan worden bepaald, is begonnen met een vergelijking van het DNA dat codeert voor de al bekende VC-dechlorerende enzymen: de VC-reductases *vcrA* en *bvcA*. Voor een kwantitatieve DNA-analysemethode zijn primers ter grootte van circa 20 baseparen nodig die het begin en eind van het te detecteren stuk DNA markeren: respectievelijk de forward en reverse primer. Hiervoor zijn overeenkomsten gezocht tussen de genetische codes van het *vcrA*- en het *bvcA*-gen met een gespecialiseerd computerprogramma: MegAlign. Uit de vergelijking kwamen 5 mogelijk bruikbare primers, zie tabel 4.1.

Tabel 4.1. Mogelijke primers voor detectie onbekende VC reductase genen

Naam	Sequentie primer	Baseparen	Wobbles	Locatie
P1	cgagatttYatgaaRgga cgagatttcatgaaagga (vcrA) cgagatttatgaaagga (bvcA)	18	2	vcrA: 77 bvcA: 31
P2	ttagcVggRgcaggSatagg ttagcggggcaggcatagg (vcrA) ttagcggagcaggcatagg (bvcA)	20	3	vcrA: 101 bvcA: 55
P3	tgggaRggWactccWgaagaSaat tgggagggactccgaagacaat (vcrA) tgggaaggaactccgaagacaat (bvcA)	24	4	vcrA: 616 bvcA: 593
P4	tccKaccMMgccaattgatgc tccaccggccaattgatgc (vcrA) tccaccaagccaattgatgc (bvcA)	21	3	vcrA: 1207 bvcA: 1185
P5	gccaattgatgcWggYat gccaattgatgcaggat (vcrA) gccaattgatgclggcat (bvcA)	18	2	vcrA: 1216 bvcA: 1184

Deze zijn met een ander computerprogramma (PrimerSelect, Lasergene) verder onderzocht op bruikbaarheid. De bruikbaarheid hangt af van:

- de specificiteit van de primer voor het te detecteren DNA De situering van de primers in het DNA-materiaal; de mate van overeenkomst tussen de primers van *vcrA* en *bvcA*; afwijkende baseparen heten wobbles;
- de neiging van primers tot hechting op zichzelf, zodat voor de analyse ongewenste vouwen, primer hairpins genoemd, ontstaan;
- de ongewenste neiging van primers, in plaats van aan het te detecteren DNA, aan elkaar te hechten, leidend tot zogenaamde primer-dimers.

Uit deze computermatige analyse resulteerden 2 mogelijk bruikbare primer-paren: P3P4 en P1P5. De te detecteren lengte van het DNA is voor deze beide primersets respectievelijk 600 en 1150 baseparen. Met de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) werd vastgesteld dat de P3P4- en P1P5-primers alleen volledig overeenkomen met delen van *vcrA*- en *bvcA*-genen.

4.2 Monsternemingen

In overleg met de consortiumpartners zijn de in tabel 4.2 weergegeven proeflocaties geselecteerd.

Tabel 4.2 Overzicht proeflocaties

Locatie	Fase in bodemonderzoek- en saneringstraject	Beoogd doel bij toepassing techniek
Groningen	Sanering restverontreinigingen	Bepalen haalbaarheid MNA*)
Nieuw-Weerdinge	Uitvoering beheersmaatregel	Beperken beheersmaatregelen m.b.v. NA
Amsterdam	Nazorg na ontgraving	Verifiëren NA voor beperken nazorg
Tilburg gemeente, 4 deellocaties	Ontwerp gebiedsgericht grondwaterbeheer	Bepalen mogelijke interventie maatregelen
Tilburg Spoorlocatie	Sanering restverontreinigingen	Bepalen haalbaarheid MNA*)
Oldenzaal	Nazorg na ontgraving	Bepalen effect sanering op NA
Rotterdam, 4 deellocaties	Ontwerp gebiedsgerichte aanpak	Beperken actieve maatregelen

*) Monitoren van Natuurlijke Afbraak

Op elk van deze proeflocaties zijn, op basis van bekende informatie over bodemopbouw, verontreinigings situatie en (indien beschikbaar) geochemische condities, peilbuizen gekozen voor de bemonstering. Voor de peilbuisselectie was het kunnen trekken van eenduidige conclusies ten aanzien van VC-omzetting bepalend. Ten behoeve hiervan zijn, indien mogelijk, peilbuizen uit zowel het verontreinigingsbron- als pluimgebied bemonsterd (zie tabel 4.3). Bij de uiteindelijke bemonstering speelden ook praktische zaken als terugvindbaarheid van (soms lang geleden geplaatste) peilbuizen een rol. In principe was er ruimte voor circa 10 monsters per locatie in één bemonstering- en analyseronde. Door combinatie met andere projecten kon voor de locatie Rotterdam een groter aantal monsters worden meegenomen en zijn in Oldenzaal 2 bemonstering rondes uitgevoerd. Op de locaties Groningen en Gemeente Tilburg zijn aanvullende analyses uitgevoerd om de condities die van belang zijn voor biologische afbraak in kaart te brengen. Op de andere locaties was dit eerder al gebeurd.

Tabel 4.3 Testlocaties en omvang onderzoek

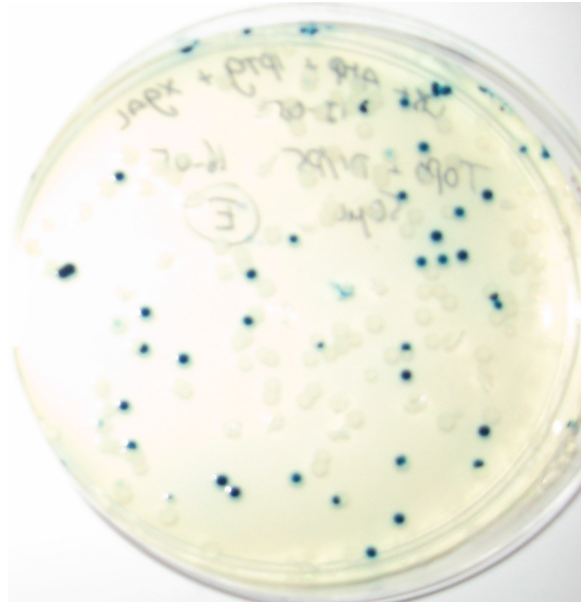
Locatie	Aantal peilbuizen/monsters
Groningen	12
Nieuw-Weerdinge	9
Amsterdam	12
Tilburg gemeente, 4 deellocaties	12
Tilburg Spoorlocatie	10
Oldenzaal, 2 rondes	2 x 11
Rotterdam, 4 deellocaties	27

Van de locaties zijn monsters geselecteerd voor het inzetten van batches, waarmee geprobeerd is VC-dechlorerende culturen te kweken. Voor de primerontwikkeling is tevens gebruik gemaakt van beschikbaar monster materiaal van enkele andere locaties, die verder buiten dit project vallen.

4.3 Eerste fase tests

De potentiële nieuwe primers zijn getest op een aantal monsters van de proeflocaties.

Om de specificiteit van de nieuwe P3P4- en P1P5-primers te bevestigen is van verkregen PCR-producten van beide primer-paren een zogenaamde clone library gemaakt: het geamplificeerde DNA is ingebouwd (inserts) in gemakkelijk kweekbare micro-organismen die vervolgens zijn opgekweekt (zie figuur 4.1). Hiermee kan de genetische code van afzonderlijke PCR-producten worden vastgesteld en geïdentificeerd aan de hand van een database.



Figuur 4.1: Voorbeeld van een clone-library.

Dit resulteerde in ruim 100 kolonies, waarin door controle d.m.v. elektroforese op een agarose-gel (zie figuur 4.2) kon worden vastgesteld in welke het insert succesvol bleek te zijn ingebouwd.



Figuur 4.2.: De hoge banden geven aan dat het insert is ingebouwd, de lage banden laten monsters zien waarbij het insert niet is ingebouwd

Het gevormde DNA is geïdentificeerd (door MWG-Biotech) en vergeleken met alle tot nu toe bekende genetische informatie (in BLAST zoekactie in de NCBI-databank). Dit bleek uitsluitend DNA van de al bekende *vcrA*- en *bvcA*-reductasegenen te zijn.

Hieruit blijkt dat de nieuwe P3P4 en P1P5-primersparen specifiek zijn voor *vcrA* en *bvcA*, d.w.z.:

- geen irrelevante andere genen detecteren;
- evenmin relevante andere genen, zoals 16S rRNA van *Dehalococcoides* detecteren;
- geen andere VC-reductases laten zien die lijken op *vcrA* en *bvcA*.

De resultaten van real-time PCR met de P3P4-primers set toonde verschillende pieken in het smelt patroon, hetgeen een indicatie is voor de vorming van een specifiek product. Elektroforese op een agarosegel leidde tot een groot aantal verschillende banden. Hieruit is geconcludeerd dat primer-dimers (zie § 4.1) zijn gevormd. In tegenstelling tot de P1P5 primers set is de P3P4-primers set daarmee ongeschikt voor de beoogde VC-reductaseanalyse.

4.4 Uitvoering PCR's

De DNA-analyses zijn uitgevoerd in het laboratorium van TNO in Utrecht. De watermonsters zijn eerst gefiltreerd om de cellen te concentreren. Per monster is van het verzamelde materiaal op drie afzonderlijke filters het DNA geïsoleerd en gereinigd. Per DNA-extract zijn verschillende verdunningen gebruikt voor de verdere analyses. Met behulp van universele primers (338 F/536R) is de kwaliteit van de DNA-extracten getest.

Kwantitatieve PCR's zijn uitgevoerd op monsters van de proeflocaties en op monsters uit de ingezette batches. De analyse is in duplo verricht op het materiaal van twee filters (één is in reserve gehouden), zodat vier getallen werden verkregen. Hierbij zijn de primers gebruikt voor het aantonen van de aanwezigheid van DNA kenmerkend voor:

- *Dehalococcoides* (tientallen stammen);
- het enzym TCE-reductase (*tceA*, ter controle);
- de bekende VC-reductases *vcrA* en *bvcA*;
- het totaal aan VC-reductases (m.b.v. de nieuw ontwikkelde primer P1P5; op een steekproef van de monsters).

In totaal zijn dus 5 verschillende real time PCR-analyses voor specifieke genen, zogenaamde assays, uitgevoerd.

4.5 Uitwerking data

De resultaten van de analyses met de al eerder beschikbare primers zijn weergegeven in bijlage 1 en in de figuren in hoofdstuk 5. Vermeld zijn de gemiddelden van de 4 verkregen meetwaarden. Tevens is, als maat voor de spreiding van de meetwaarden en daarmee de (on)nauwkeurigheid van de analyse, per monster de standaarddeviatie (te omschrijven als de gemiddelde afwijking van het gemiddelde) uitgerekend en met behulp van een foutbalk weergegeven in de figuren in hoofdstuk 5. Voor het bepalen van de (on)nauwkeurigheid van de analyse is verder de variatiecoëfficiënt (de standaarddeviatie gedeeld door het gemiddelde) uitgerekend; zie voor de bespreking hoofdstuk 6.

In bijlage 1 zijn tevens zoveel mogelijk bekende gegevens en voor enkele locaties de resultaten van aanvullend chemisch onderzoek opgenomen. Deze worden besproken in hoofdstuk 5.

De testresultaten van de nieuw ontwikkelde primers set zijn voor de onderzochte monsters en batches weergegeven in respectievelijk onderstaande tabellen 4.4 en 4.5.

Tabel 4.4 Testresultaten grondwatermonsters nieuwe primer (genkopieën/ml grondwater)

Locatie	Monsternaam	p1/p5	vcrA	bvcA	vcrA + bvcA
Amsterdam	Pb 420	4,59E+05	2,22E+05	<15	2,22E+05
22-11-2007	Pb 472	3,84E+04	4,30E+03	6,52E+03	1,08E+04
	Pb 473	2,17E+04	1,14E+04	2,01E+02	1,16E+04
	Pb 5090	2,76E+03	5,42E+02	7,20E+02	1,26E+03
Nieuw-Weerdinge	Db 2 - 34m	1,55E+02	<140	2,32E+02	2,32E+02
16-11-2007	Mf 15 - 27m	<20	<140	<20	<140
	Db 2 - 23,5m	3,15E+03	<140	1,00E+03	1,05E+04
	Db 3 - 24m	<20	<140	<20	<140
Oldenzaal	Pb 304	2,18E+04	1,22E+03	3,28E+01	1,25E+03
1-10-2007	pb 104	<20	<1000	2,06E+02	2,06E+02
	pb 307.7m	6,35E+03	<1000	<10	<1000
	pb 1022	<20	<1000	<10	<1000
Tilburg II	804	1,89E+05	3,90E+05	1,05E+02	3,90E+05
30-5-2007	2005	<20	<100	8,43E+02	8,43E+02
	705	<20	<100	<10	<100
	610	<20	<100	<10	<100
Den Haag HIP	pb 35-9m	3,15E+02	1,07E+03	9,16E+02	1,99E+03
31-1-2008	pb 34-9m	<20	<1500	2,76E+03	2,76E+03
	pb 43-9m	<20	<1500	<200	<1500
	pb 48	<20	<1500	<200	<1500

Tabel 4.5 Testresultaten batches (van grondwatermonsters) nieuwe primer (genkopieën/ml grondwater)

Monsternaam	p1/p5	vcrA	bvcA	vcrA + bvcA
DNA Amsterdam pb421	1,01E+07	6,49E+06	1,70E+04	6,51E+06
DNA Nieuw-weerdinge pb23,5 VC	2,86E+05	<4500	3,26E+06	3,26E+06
DNA Groningen pb404 VC	3,76E+06	7,80E+07	9,66E+05	7,90E+07
DNA Groningen pb100-61m VC	5,47E+06	4,78E+06	2,40E+05	5,02E+06
DNA AKZO WF2 VC	6,55E+07	1,36E+07	2,22E+06	1,58E+07
DNA AKZO WF4 VC	4,87E+06	5,23E+07	8,57E+03	5,23E+07
DNA Gem. Tilburg pb401 20m VC	<20000	1,12E+04	<750	1,12E+04
DNA Gem. Tilburg pb 54 4m VC	<20000	<4500	<750	<4500
DNA Spoor Tilburg RH05 22m VC	<20000	<4500	1,67E+04	1,67E+04
DNA Spoor Tilburg RH48 VC	<20000	<4500	<750	<4500

Uit de vergelijkbare grootteordes van vrijwel alle meetresultaten in de eerste en de laatste data-kolommen van de tabellen 4.4 en 4.5 blijkt dat gebruik van primer P1P5, in principe, dezelfde resultaten oplevert als de afzonderlijke primers voor *vcrA* en *bvcA*. Wel is de detectiegrens in de batchmonsters van P1P5 beduidend hoger: een factor van circa 50.

5 Interpretatie resultaten proeflocaties

5.1 Algemeen

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de proeflocaties, die weergegeven zijn in bijlage 1, uitgewerkt. Dit gebeurt op basis van een beknopte locatiebeschrijving met verontreinigingssituatie en bodemopbouw. De vermelde gegevens beperken zich tot die welke relevant zijn voor het valideren, testen en demonstreren van de nieuwe DNA-analyses op VC-reductasegenen. Voorts zijn deze gegevens afhankelijk van de beschikbare informatie en de wijze waarop deze is gerapporteerd, hetgeen per locatie verschilt. In tabel 1 is met kleurindicaties voor de meest relevante parameters – redoxparameters, mate van omzetting, indien beschikbaar concentratieverloop in de tijd en EPA-score – aangegeven of deze – op basis van ervaringsgegevens en proceskennis – wijzen op (on)gunstige condities voor VC-afbraak. De resultaten van de uitgevoerde analyses op de VC-reductasegenen en op *Dehalococcoides* zijn tevens grafisch weergegeven in de figuren 5.1 t/m 5.8. Getoond worden de gemiddelde waarden. Bij alle monsters waarvoor voldoende meetresultaten (dubbele duplo's) zijn verkregen, zijn tevens de standaarddeviaties in de vorm van een foutbalk weergegeven. Merk op dat op de y-as een logaritmische schaal is gehanteerd, die begint bij 10 organismen/ml.

In dit hoofdstuk staat het nut van deze analyses voor een beter inzicht in de biologische afbraak op de locaties centraal. Daarom worden hier alleen de resultaten van de afzonderlijke DNA-analyses beschouwd, waarmee de meest omvangrijke dataset is verkregen. Zoals besproken in § 4.5 zijn met de totaalanalyse voor VC-reductasegenen vergelijkbare resultaten geboekt.

Aan het eind van dit hoofdstuk is in een samenvattende overzichtstabel voor elk van de proeflocaties het concrete advies voor de verdere aanpak opgenomen dat op basis van het uitgevoerde onderzoek kan worden gegeven.

5.2 Locatie Groningen

5.2.1 Beschrijving

De locatie is gesitueerd in een woonwijk ten noordwesten van de binnenstad van Groningen aan de Oranjestraat en Verlengde Grachtstraat. Als gevolg van de bedrijfsactiviteiten van een chemische wasserij en ververij is tussen 1905 en 1973 de bodem hier verontreinigd geraakt met minerale olie, vluchtige aromaten en vluchtige chloorkoolwaterstoffen. In 1988 heeft een grondsanering plaatsgevonden waarbij binnen damwanden verontreinigingen tot 8,5 m –mv zijn ontgraven. Plaatselijk zijn sterke grondverontreinigingen achtergebleven. Door bemaling tijdens de grondsanering zijn het ondiepe en diepe grondwater slechts gedeeltelijk gesaneerd.

De bodem ter plaatse is opgebouwd uit (van boven naar beneden) een deklaag van zand (tot 1 m –mv), klei (tot 5 m –mv) en keileem (tot 9 m –mv), het 1^e watervoerend pakket van zeer fijn zand (tot 23 m –mv), de 1^e scheidende laag met zeer fijn slibhoudend zand (tot 33 m –mv) en potklei (tot 35 m –mv), het 2^e watervoerende pakket met matig fijn tot matig grof zand (tot 62 m –mv), de 2^e scheidende laag van klei en zeer fijn slibhoudend zand (tot 67 m mv) en het 3^e watervoerende pakket van grof zand en grind met de hydrologische basis op 220 m –mv. Inzijing vindt plaats van het freatische pakket naar het 1^e en vervolgens het 2^e watervoerende pakket.

Onderin het 1^e watervoerende pakket (circa 20 m –mv) zijn dermate hoge concentraties aan VOCl aangetoond dat hier de aanwezigheid van puur product (zaklaag) wordt vermoed. De grondwaterverontreiniging strekt zich in noordelijke richting uit tot andere percelen aan de Verlengde Grachtstraat en percelen aan de Plantsoenstraat en de Selwerderdwarsstraat. In 2000 heeft de provincie Groningen, op basis van onderzoek dat in 1998 en 1999 is uitgevoerd, beschikt dat het hier een geval van ernstige bodemverontreiniging betreft, waarvan sanering dient aan te vangen voor 21 maart 2010.

Geraadpleegde literatuur: grondwateronderzoek Oranjestraat te Groningen; Grontmij 2009.

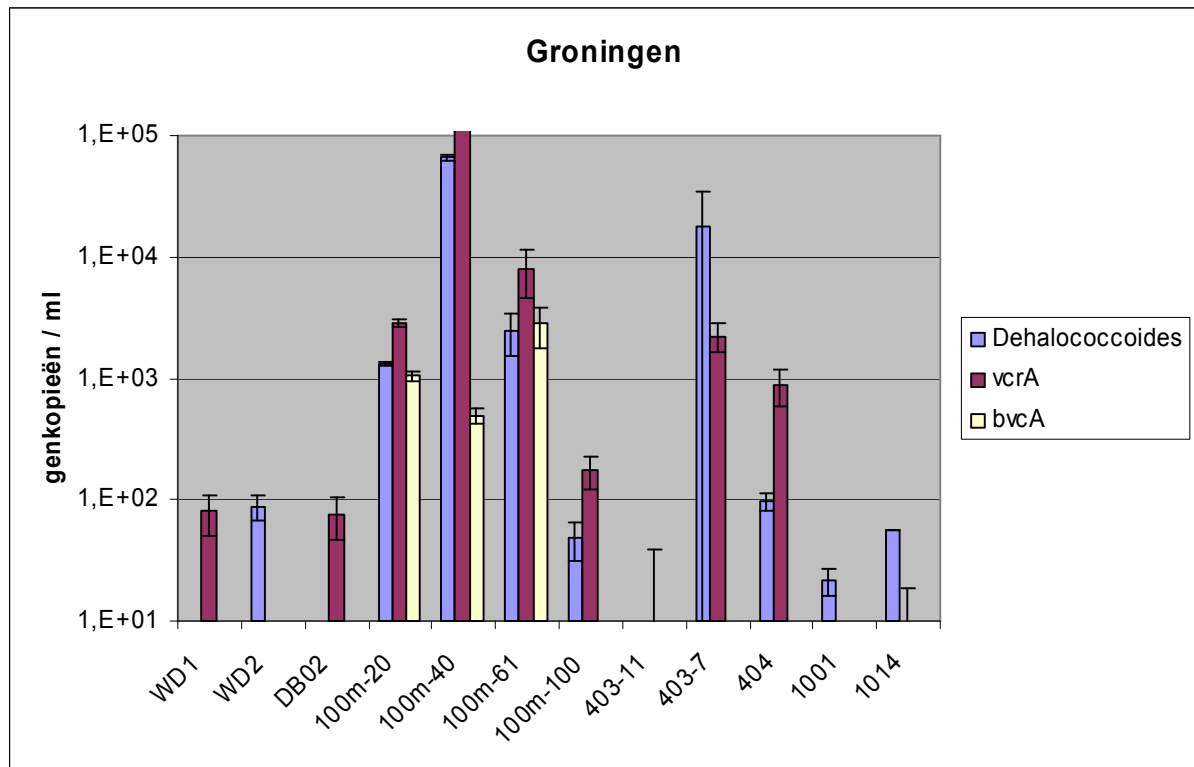
5.2.2 Evaluatie

Uit de beschikbare en de nieuwe verkregen gegevens blijkt voor proeflocatie Groningen het volgende:

- de geochemische condities voor de gewenste reductieve dechlorering zijn sterk wisselend, maar alleen goed te noemen in het 2^e watervoerende pakket t.p.v. de 100m-boring, waar de organische stofconcentraties voldoende hoog en de sulfaatconcentraties laag genoeg zijn;
- er is geen duidelijk verschil gevonden in geochemische condities tussen de veronderstelde kern- en pluimgebieden. Wel zijn de sulfaatconcentraties in de deklaag duidelijk lager dan in het 1^e watervoerende pakket. De sulfaatconcentraties in het 2^e watervoerende pakket zijn uitgesproken laag, terwijl de hoogste sulfaatconcentratie in het 3^e watervoerende pakket is gemeten.
- in vergelijking met onderzoek uit 1999 blijkt over het algemeen een toename van het totaal aan CKW-concentraties. Wel is bij enkele peilbuizen, nr. 404 (8 m –mv) en WD 1, een duidelijke afname van de hoger gechlorideerde CKW's te constateren, hetgeen een aanwijzing is voor -in ieder geval- gedeeltelijke afbraak;
- in overeenstemming met vrij gunstige geochemische condities is t.p.v. de 100m-boring in het 2^e watervoerende pakket etheen aangetoond, hetgeen aannemelijk maakt dat hier volledige biologische afbraak tot en met etheen plaatsvindt. Ook t.p.v. van DB02, 403 (2 dieptes) en 404 is etheen aangetroffen. Op basis van de hier minder gunstige geochemische condities voor reductieve dechlorering, relatief weinig organische stof en veel sulfaat, is dit etheen mogelijk niet op deze plaatsen gevormd maar van elders (stroomopwaarts) afkomstig. Daarom kan op basis van deze gegevens nog niet worden geconcludeerd dat de verontreiniging hier ter plaatse volledig wordt omgezet (maar: zie hieronder);
- in de meeste peilbuizen zijn *Dehalococcoides*-bacteriën en/of VC-reductasegenen aangetroffen (figuur 5.1). In veel peilbuizen betreft het echter relatief lage concentraties, zodat hier geen significante omzetting van CKW's zal plaatsvinden;
- in overeenstemming met bovenstaande bevindingen zijn zowel genen voor *Dehalococcoides* als VC-reductase in relatief hoge concentraties aangetroffen t.p.v. de 100m-boring in het 2^e watervoerende pakket. Minder in overeenstemming met bovenstaande bevindingen zijn relatief hoge concentraties *Dehalococcoides* ook t.p.v. peilbuis 403 (6 m –mv) aanwezig en t.p.v. de 100m-boring in het 1^e watervoerende pakket. In deze peilbuizen, in 404 en t.p.v. de 100m-boring in het 3^e watervoerende pakket is *vcrA* in relatief hoge concentraties aangetroffen. In combinatie met de aanwezigheid van etheen is het aannemelijk dat op deze plaatsen in deze bodemlagen, ondanks de ogenschijnlijk minder gunstige geochemische condities, toch volledige omzetting van chloorkoolwaterstoffen plaatsvindt;
- vooral het voorkomen van de gewenste organismen in de watervoerende pakketten – in het 1^e en 3^e wvp ondanks relatief hoge sulfaatconcentraties – is gunstig, omdat hierdoor de veronderstelling gerechtvaardigd is dat verspreiding in verticale richting zal worden gecompenseerd door afbraak.

Op basis van de bovenstaande bevindingen kan voor proeflocatie Groningen het volgende worden geconcludeerd:

- volledige natuurlijk dechlorering van chloorkoolwaterstoffen treedt op de locatie op, maar zal op veel plaatsen, gezien de relatief lage genconcentraties, vermoedelijk slechts langzaam verlopen;
- gezien de langzame NA zal, met name in het horizontale vlak, verdere verspreiding van de verontreiniging plaatsvinden;
- omdat het genetisch materiaal voor de juiste organismen en enzymen vrijwel overal aanwezig is, kan de natuurlijke afbraak in principe relatief snel en eenvoudig worden gestimuleerd door middel van elektronendonordoseringen op een aantal strategische plaatsen. Een dergelijke saneringsmaatregel zal naar verwachting verspreiding tegengaan en een belangrijk deel van de verontreiniging verwijderen en daarmee toekomstige langdurige actieve nazorg kunnen beperken.



Figuur 5.1: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis.

5.3 Locatie Nieuw-Weerdinge

5.3.1 Beschrijving

Ter plaatse van de voormalige Gerofabriek aan het 1^e Kruisdiep in Nieuw Weerdinge is in de periode van 1947 tot 1975 een verontreiniging in de bodem en het slootslib ontstaan van PER en TRI en afbraakproducten en plaatselijk andere verontreinigingen (1,1-dichloorethaan, chloormethanen, benzine/olie, cyanide, cresol, chloorfenol en zware metalen). In 1995 is een (tijdelijke) beveiligingsmaatregel ingesteld, met het doel de grondwaterverontreiniging door middel van grondwateronttrekking te beheersen. Men wenst meer zekerheid te krijgen over de effectiviteit van deze maatregel.

De bodem bestaat tot grote diepte uit een zandpakket dat is opgebouwd uit lagen die in samenstelling variëren van zeer en matig fijn tot matig en zeer grof. Op circa 28 m –mv is een kleilaag aanwezig met een dikte van minder dan 1 m. De hydrologische basis ligt op circa 135 m –mv.

Op de locatie bevindt zich een omvangrijke CKW-verontreiniging van twee deels overlappende pluimen die zich in horizontale richting over honderden meters en in verticale richting tot mogelijk circa 80 m –mv heeft verspreid. Beheersing van de verontreiniging vindt plaats door een intensieve grondwateronttrekking, met 6 deepwells en een drain, en zuivering. Indien gebruik zou kunnen worden gemaakt van biologische afbraak is extensivering van de beheersmaatregelen wellicht mogelijk, hetgeen vanwege de jaarlijkse hoge kosten een aanzienlijke kostenbesparing zou kunnen opleveren.

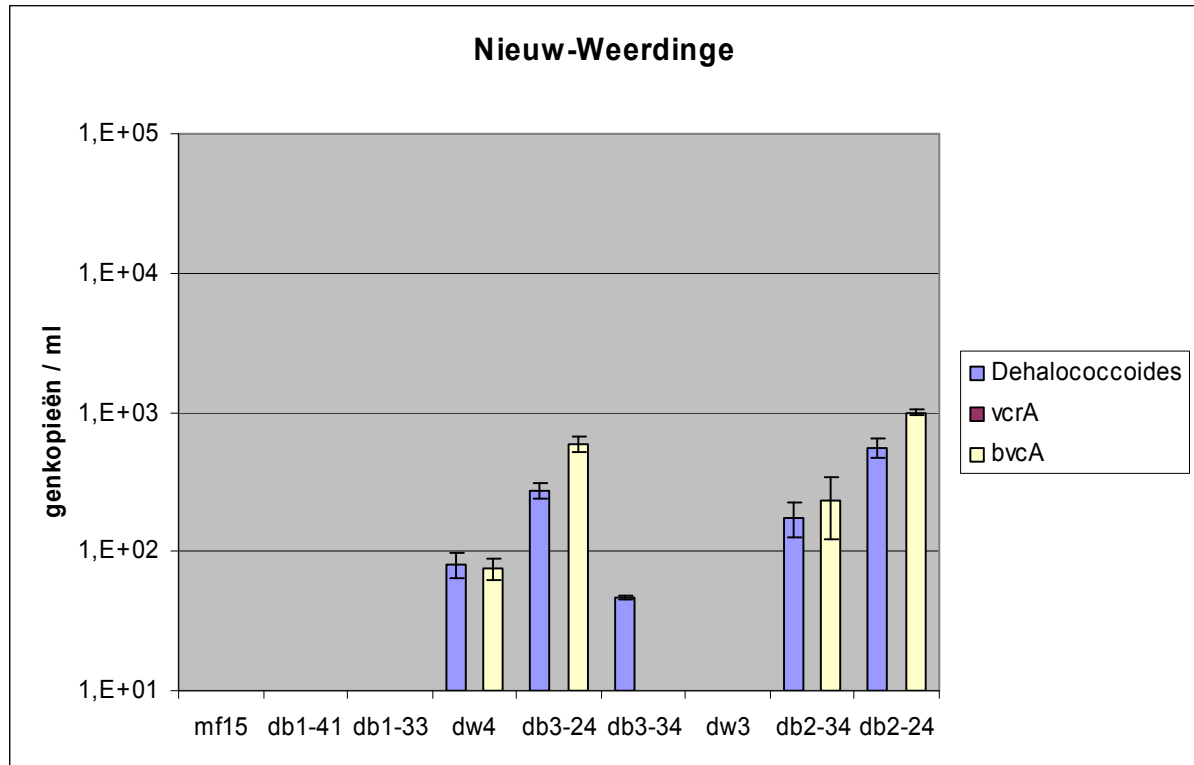
Bij in 2001 uitgevoerd onderzoek is gevonden dat de concentraties organisch stof (TOC variërend van 8 tot 54 mg/l) in het gebied over het algemeen voldoende zijn voor reductieve dechlorering en tevens is plaatselijk de aanwezigheid van *Dehalococcoides* kwalitatief aangetoond. De sulfaatconcentraties zijn hiervoor echter op de meeste plaatsen relatief hoog (enkele tientallen tot 67 mg/l). In de verschillende peilfilters variëren de CKW-concentraties aanzienlijk; in sommige overheerst afname, in andere toename. Een duidelijke toename in CKW-concentraties in de diepere filters (34 m –mv) van db 2 en db 3 kan veroorzaakt zijn door het aantrekken van verontreinigingen door respectievelijk deepwells 3 en 4.

Geraadpleegde literatuur:

- saneringsonderzoek Eerste Kruisdiep WZ 70 Nieuw Weerdinge [DR-050-67]; Royal Haskoning, 22 mei 2003;
- monitoring grondwaterbeheersing van een bedrijfslocatie gelegen aan het 1^e Kruisdiep te Nieuw-Weerdinge (jaar 2006); Tebodin, 18 april 2007.

5.3.2 Evaluatie

Op basis van de beschikbare gegevens waren eenduidige conclusies over biologische afbraak tot nu toe niet te trekken. Uit de moleculaire analyses blijkt nu dat ter plaatse van de filters db 2 (24 en 34 m –mv) en db 3 (24 m –mv) de voor volledige reductieve dechlorering gewenste genen in redelijk hoge concentraties aanwezig zijn (figuur 5.2). Naast *Dehalococcoides* is tevens het gen voor *bvcA* aangetroffen. Dit biedt kansen voor het extensiveren van de sanering. Hierbij kan worden gedacht aan het deels uitschakelen van de installatie. Gezien de ligging van db 2 en db 3 kan uitschakeling van de deepwells 3 en 4 worden overwogen, hoewel in de deepwells zelf ogenschijnlijk nauwelijks dechloreringscapaciteit aanwezig is. Maar het niet aantreffen van dechlorerende micro-organismen in deepwell 3 en de lage gedetecteerde aantallen in deepwell 4 kunnen een gevolg zijn van de grondwateronttrekking. Voordat definitief tot uitschakeling besloten kan worden, moet eerst wel een uitgebreidere steekproef van DNA-analyses in grondwatermonsters worden gedaan. Na uitschakeling van de deepwells zullen de effecten daarvan goed moeten worden gevolgd. Gezien de relatief lage genconcentraties die (vooral nog) zijn aangetroffen, moet er wel rekening mee worden gehouden dat nog lange tijd verontreinigingen aanwezig blijven.



Figuur 5.2: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis.

5.4 Locatie Amsterdam

5.4.1 Beschrijving

Het voormalige bedrijfsterrein van Roland, Jan van Riebeeckhavenweg 12 te Amsterdam, is verontreinigd met de chloorkoolwaterstoffen PER, TRI, CIS en VC. Na een grondsanering van het brongebied, uitgevoerd in 2000 en 2001, zijn restverontreinigingen achtergebleven.

De bodem ter plaatse is opgebouwd uit (van boven naar beneden) opgespoten matig fijn zand, een klei/veenlaag (op 5 à 7 m –mv), matig fijn tot grof zand met rond 15 m –mv een veenlaag van enkele decimeters, fijn zand met kleilaagjes (tot circa 21 m –mv) en het 1^e watervoerend pakket met matig grof zand tot 52 m –mv, waar zich een 3 meter dikke kleilaag bevindt.

Momenteel vindt nazorg in de vorm van monitoring plaats. In het ondiepe grondwater in de ophooglaag tot 5,5 m –mv zijn tijdens monitoringen in 2004, 2006 en 2008 over het algemeen afnemende CKW-concentraties en voortgaande dechlorering gevonden. Ter plaatse van enkele peilbuizen fluctueren de concentraties: in peilbuis 113, stroomafwaarts van het brongebied, trad in 2006 tijdelijk een lichte toename van concentraties CIS en VC op en in peilbuis 472, net buiten het voormalige ontgravingvak, nemen de CKW-concentraties, na afname in 2006, inmiddels weer toe. In het diepere grondwater, in het zand boven het veen in de deklaag, fluctueren de concentraties meer en is slechts plaatselijk een duidelijke afname waarneembaar. In peilbuis 476 zijn evident toenemende concentraties CIS en VC waargenomen. De omstandigheden voor reductieve dechlorering zijn matig met ijzerreducerende tot methanogene redoxcondities en redelijk hoge concentraties organische stof, maar hoge sulfaatconcentraties. Op basis van deze resultaten moet nader worden onderzocht of voor de verdere nazorg kan worden volstaan met het monitoren van de natuurlijke afbraak.

Geraadpleegde literatuur:

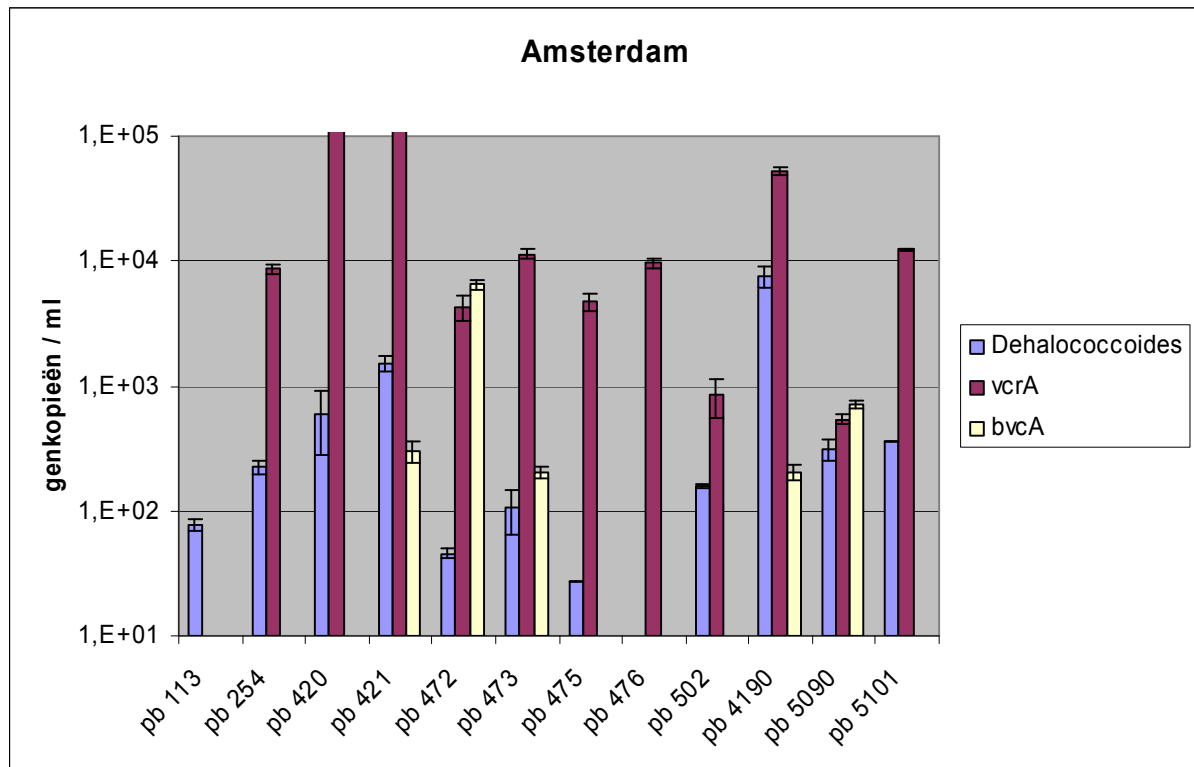
- voortgang grondwatermonitoring voormalig Roland-terrein te Amsterdam, Tauw, concept, 14 december 2006;
- grondwatermonitoring 2006 en 2008 voormalig Roland-terrein te Amsterdam, Tauw, concept, 15 januari 2009.

5.4.2 Evaluatie

Uit de resultaten blijkt dat vooral één van de beide onderzochte VC-reductasegenen (*vcrA*) op bijna alle onderzochte plaatsen en bodemlagen – tussen 3 en 10 m -mv – in relatief hoge concentraties aanwezig is (figuur 5.3). Uitzondering is alleen peilbuis 113, waar eerder een toename van onder andere de VC-concentratie is geconstateerd. Het andere VC-reductasegen (*bvcA*) is in lagere concentraties aanwezig en ook het totaal *Dehalococcoides* 16S rRNA gen is op een aantal plaatsen in relatief (te) lage aantallen aanwezig, met name in de peilbuizen 113, 472, 475 en 476. Op deze locatie zou analyse op alleen *Dehalococcoides* daarom tot een veel minder stellige conclusie hebben geleid. Opmerkelijk is de aanwezigheid van *vcrA* op plaatsen waar eerder hoge concentraties van sulfaat zijn gevonden, dat – naar de huidige inzichten – remmend werkt op volledige dechlorering. Dit is mogelijk te verklaren doordat in bodems met uiteenlopende poriëngroottes niches met sterk verschillende redoxcondities vlak naast elkaar kunnen bestaan.

Verder valt op dat in twee van de vier diepere peilbuizen in het bovenste zand van de deklaag, nr. 502 met fluctuerende vrij lage CKW-concentraties en nr. 5090 met fluctuerende relatief hoge CKW-concentraties, de VC-reductasegenconcentraties relatief aan de lage kant zijn. Dit wijst er op dat de afbraakcapaciteit voor VC, in ieder geval plaatselijk, naar de diepte toe minder wordt. In de diepere peilbuis 476 zijn de toenemende concentraties CIS en VC mogelijk te verklaren door het ontbreken van *Dehalococcoides*, waarvan de aanwezigheid in het geheel niet kon worden aangetoond. *VcrA*-genen zijn echter wel aangetroffen, hetgeen er op wijst dat afbraakcapaciteit voor VC aanwezig is. Tpv diepere peilbuis 5101 is juist een afname van VC-concentraties waargenomen, die nu – mede gezien de aanwezigheid van etheen en ethaan – mogelijk is te verklaren door relatief hoge concentraties *vcrA*-genen.

De resultaten ondersteunen de gekozen wijze van nazorg. Bij de toekomstige monitoring moet vooral aandacht worden geschonken aan het diepere grondwater, aangezien de afbraakcapaciteit voor VC naar de diepte toe wat af lijkt te nemen.



Figuur 5.3: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis.

5.5 Locaties gemeente Tilburg

5.5.1 Beschrijving

Voor het ontwikkelen van gebiedsgericht bodemsaneringsbeleid onderzoekt de gemeente Tilburg een aantal met CKW's verontreinigde locaties op de mogelijkheden gebruik te maken van biologische afbraak. Het betreft:

- Havendijk 43, t.p.v. een voormalige chemische wasserij waar eerder een grondsanering is uitgevoerd;
- Sint Ceciliastraat 23, de voormalige Vormenfabriek, waar ook diverse andere verontreinigingen (minerale olie, aromaten en zware metalen) aanwezig zijn;
- Bosscheweg 4A in het buitengebied (Berkel-Enschot) waar de verontreiniging is ontstaan door overslag van oplosmiddelen van groot- naar kleinverpakking. Ook hier zijn andere verontreinigingen aanwezig (eveneens minerale olie, aromaten en zware metalen);
- Regenboogpark, het voormalige Regenboogterrein, een chemische wasserij waar grondwateronttrekking en –zuivering plaatsvindt.

De bodem is opgebouwd uit overwegend zand met plaatselijk leem- en kleilagen. Het freatisch pakket, met vooral fijn zand, gaat rond 15 m –mv over in het 1^e watervoerend pakket, met voornamelijk grof zand. Plaatselijk vormen niet aaneengesloten leem- en veenlagen een semi-scheidende laag tussen freatisch en 1^e watervoerend pakket.

De verontreinigingen zijn in verticale richting over het algemeen doorgedrongen tot in het 1^e watervoerend pakket en strekken zich in horizontale richting uit over een afstand van enkele honderden meters.

Geraadpleegde literatuur:

- monitoring grondwaterkwaliteit 2007, Havendijk 43 te Tilburg, Oranjewoud, 21 september 2007;
- nader bodemonderzoek Vormenfabriek en omstreken Tilburg, Oranjewoud, 17 maart 2005;
- aanvullend bodemonderzoek Bosscheweg 4a e.o. te Berkel-Enschot, Oranjewoud, 13 augustus 2007 met voorgaande onderzoeken van Wiertsema en Milon;
- saneringsplan Regenboogpark, TTE, 16 juli 2007.

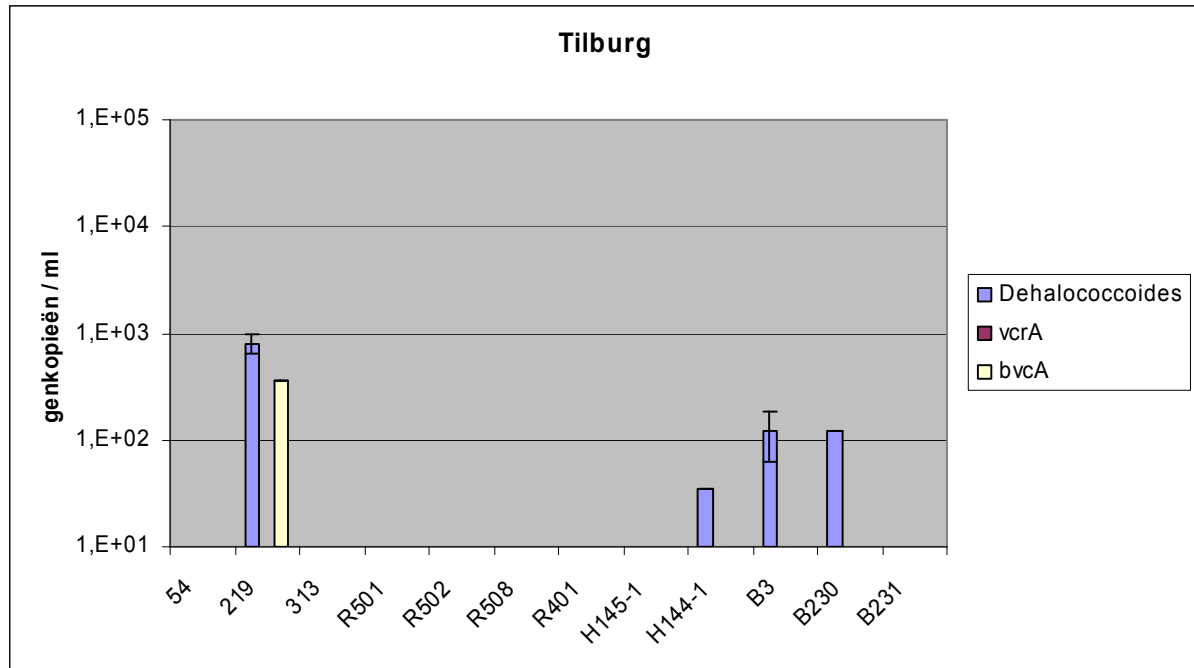
5.5.2 Evaluatie

De vier locaties zijn uitgebreid onderzocht om te bepalen of hier in het kader van het gemeentelijke gebiedsgerichte grondwaterbeheer interventie maatregelen noodzakelijk zijn. De monsters zijn zo goed mogelijk verdeeld over verontreinigingbronnen en -pluimen.

Uit de in de bijgevoegde tabel opgenomen resultaten blijkt het volgende:

- de geochemische condities zijn over het algemeen ongunstig voor reductieve dechlorering. Het betreft voornamelijk een gebrek aan organische stof (DOC), dat nodig is als elektronen-donor, en een teveel aan sulfaat, dat als concurrerende elektronenacceptor fungeert;
- er is geen duidelijk verschil gevonden in geochemische condities tussen de veronderstelde kern- en pluimgebieden, hetgeen erop duidt dat er geen aantoonbare biologische interactie is tussen verontreinigende stoffen en geochemie;
- in overeenstemming met de ongunstige geochemische condities is nergens etheen, het gewenste eindproduct van reductieve dechlorering, aangetroffen;
- in tegenstelling tot bovenstaande bevindingen zijn op de locaties Vormenfabriek en Bosscheweg plaatselijk toch *Dehalococcoides* aangetroffen (figuur 5.4). Ook is het gen voor het bekende enzym voor TRI-afbraak, *tceA* in de helft van de peilbuizen in relatief hoge concentraties aanwezig (zie bijlage 1). Dit duidt op gedeeltelijke omzetting van chloorkoolwaterstoffen;
- op deze locatie is tevens geanalyseerd op *Desulfitobacterium*, een organisme dat in staat is PER en TRI te dechloreren tot CIS. In geen van de monsters werd dit organisme aangetroffen (detectiegrens 200 genkopieën/ml);
- VC-reductasegenen zijn op de meeste plaatsen niet aangetroffen. Uitzondering vormt peilbuis 219 waar ook *Dehalococcoides* aanwezig is en waar de laagste sulfaatconcentratie is gemeten. Uit vergelijking met gegevens uit 2005 blijkt dat de CKW-concentraties hier in de tussentijd sterk zijn verminderd. In 2005 zijn PER, TRI, CIS en VC gemeten in concentraties van respectievelijk 200, 68, 1116 en 13 µg/l. In 2008 is alleen PER aangetroffen in een concentratie van 34 µg/l. Met de nu verkregen gegevens is het aannemelijk dat de waargenomen concentratieverlaging is veroorzaakt door biologische afbraak middels reductieve dechlorering. Dan zou het gevormde etheen echter inmiddels al weer moeten zijn omgezet of weggestroomd, aangezien deze stof nu niet is aangetroffen.

Uit het bovenstaande blijkt dat slechts op één plaats aanwijzingen zijn gevonden voor natuurlijke afbraak. Voor de overige locaties is duidelijk aangetoond dat actieve (sanerings)maatregelen nodig zijn om verslechtering van de kwaliteit van het grondwaterlichaam tegen te gaan. Ingrijpen door middel van gestimuleerde biologische afbraak kan efficiënt zijn, als daarmee de geochemische condities worden geoptimaliseerd.



Figuur 5.4: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis.

5.6 Spoorlocatie Tilburg SBNS

5.6.1 Beschrijving

Op het NS-revisieterrein in Tilburg zijn verontreinigingen met CKW's, minerale olie en vluchtige aromaten aanwezig. In het wat diepere grondwater bevinden zich momenteel voornamelijk CIS en VC. Op het terrein worden diverse saneringsmaatregelen uitgevoerd:

- grondsanering d.m.v. ontgravingen;
- drijf laagverwijdering;
- *in situ* sanerings- en beheerssysteem (vanaf mei 2000 operationeel) met:
 - grondwateronttrekking
 - persluchtinjectie (in freatisch grondwater tot 10 m –mv)
 - bodemluchtextractie
- monitoring natuurlijke afbraak.

Ten behoeve van monitoring van natuurlijke afbraak (NA) is in 2006 onderzoek verricht. De resultaten hiervan zijn voor de nu bemonsterde peilbuizen opgenomen in bijlage 1. De conclusie is dat NA optreedt, maar mogelijk onvoldoende om verspreiding van verontreiniging tot buiten de locatie te voorkomen. Men staat nu voor de vraag of aanvullende grondwatersanering noodzakelijk is of dat natuurlijke afbraak kan volstaan. Overwogen wordt eerst aanvullende monitoring en/of grondwatermodellering uit te voeren. Het SKB-onderzoek naar VC-reductasegenen vormt een nadere onderbouwing voor de te maken keuzes.

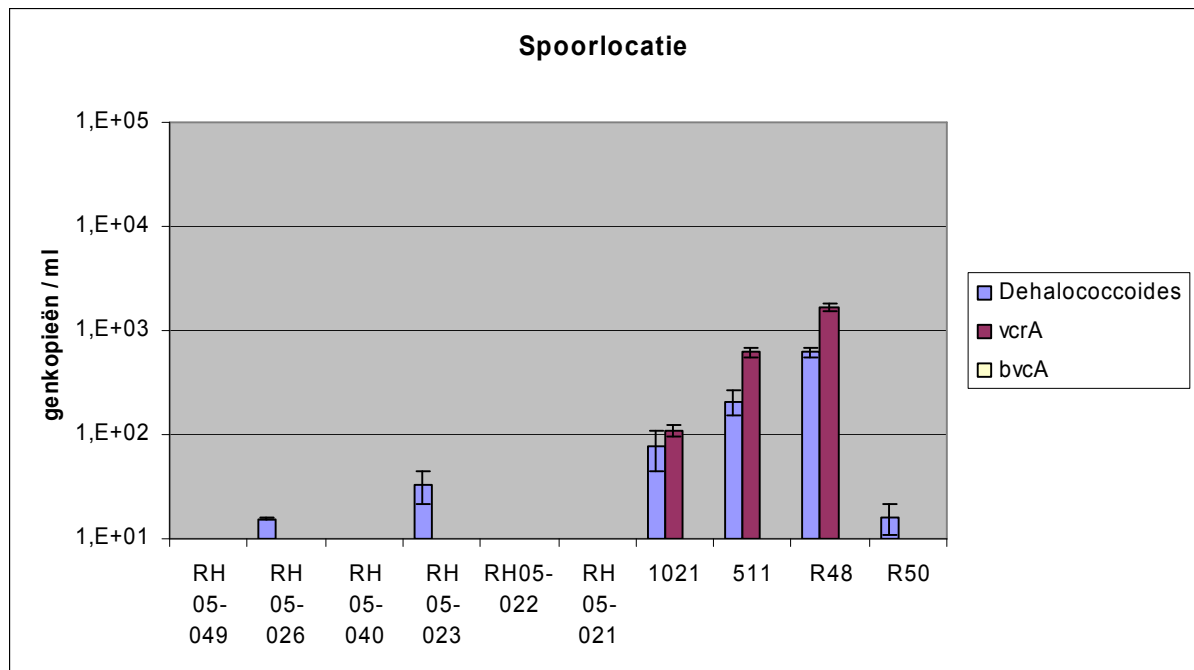
Voor de bodemopbouw wordt verwezen naar § 5.5. Bij eerder onderzoek zijn de zandpakketten hydrologisch verdeeld in freatisch, middeldiep en diep grondwater, respectievelijk tot 10, tussen 10 en 20 en dieper dan 20 m -mv

Geraadpleegde literatuur: sanering NS-Revisieterrein Tilburg, monitoring natuurlijke afbraak, Haskoning, 4 april 2007.

5.6.2 Evaluatie

Uit het nu uitgevoerde onderzoek blijkt dat op de meeste plaatsen *Dehalococcoides* aanwezig is, maar over het algemeen in relatief lage concentraties (figuur 5.5). Dit is in overeenstemming met de eerder aangetroffen voor deze organismen ongunstige relatief lage DOC-concentraties en relatief hoge sulfaatconcentraties. Desalniettemin is *vcrA* aangetroffen in 3 peilbuizen: 1021, 511 en R48, hetgeen duidt op capaciteit voor volledige reductieve dechlorering. In deze peilbuizen zijn ook de hoogste concentraties aan *Dehalococcoides* aangetroffen. Opmerkelijk is tevens dat *tceA* in relatief hoge concentraties is gemeten (zie bijlage 1) in op één na alle peilbuizen (uitzondering is RH-05-40, waar in het geheel geen voor reductieve dechlorering benodigd DNA is aangetroffen). Resten van TRI in het grondwater, al of niet veroorzaakt door nalevering vanuit de grond, worden mogelijk laag gehouden door dechlorering met *tce*-reductase.

Op basis van deze bevindingen kan het nut van modellering en het beperken van de nazorg tot monitoring worden betwijfeld. Het gericht stimuleren van biologische afbraak, zoals ook geoperd door Haskoning, lijkt een efficiënter alternatief, vooral aangezien op een aantal plaatsen het juiste genetische materiaal al voorkomt.



Figuur 5.5: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis.

5.7 Locatie Oldenzaal

5.7.1 Beschrijving

Ter plaatse van een voormalig bedrijfsterrein in Oldenzaal, waarvan de exacte locatie op verzoek anoniem blijft, is een bodemverontreiniging met chloorkoolwaterstoffen ontstaan. Er wordt een gefaseerde bodemsanering uitgevoerd. Fase 1, de actieve fase, heeft in oktober 2007 plaatsgevonden en betrof ontgraving van sterk verontreinigde grond. In fase 2, de passieve fase, wordt momenteel door het monitoren van natuurlijk afbraak vastgesteld of sprake is van een stabiele verontreinigings situatie in het grondwater. Het onderzoek naar VC-reductases vormt hiervan een onderdeel. Aandachtspunt hierbij is het mogelijk negatieve effect dat de ontgraving op de gewenste reductieve dechlorering zou kunnen hebben. Daarom is zowel direct voorafgaand aan de ontgraving als een jaar daarna een monitoringsronde uitgevoerd.

Geraadpleegde literatuur:

- aanvullend bodemonderzoek ... Oldenzaal, Verhoeve Milieu, 19 februari 2007;
- evaluatie grondsanering ... Oldenzaal, Geofox-Lexmond, 16 november 2007;
- monitoring grondwater ... Oldenzaal 25 juli 2008.

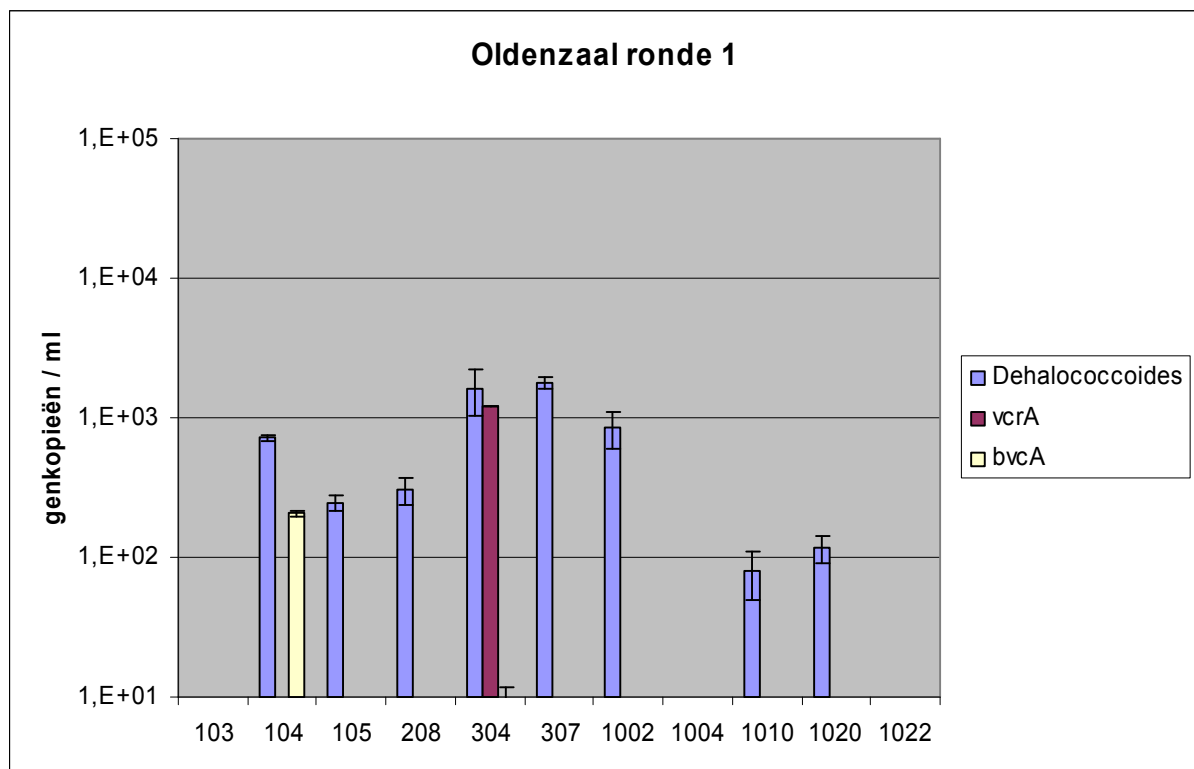
Door de ligging op een stuwwal, kent de locatie een bijzondere bodemopbouw. De bodem bestaat uit gestuwde slibhoudende fijne zanden en kleien met leemlagen, die slecht doorlatend zijn. Een op de locatie aanwezige deklaag wordt tevens beschouwd als 1^e watervoerende pakket, met een dikte van slechts 1 à 2 meter. Daaronder bevindt zich tot minimaal 22 m –mv een vrijwel ondoorlatende klei/leemlaag. Wel zijn tot 3,5 m –mv plaatselijk nog 2 zandlagen aangetroffen. De hydrologische basis van het systeem bevindt zich op de locatie derhalve al op maximaal 3,5 m –mv.

De peilbuizen 103, 307, 1010, 304 en 1022 bevinden zich nabij ontgravingen. Peilbuis 104 bevindt zich in een ontgraving. De maximale gerealiseerde ontgravingdiepte bedroeg 3,7 m –mv. De peilbuizen 104 en 1020 moesten na de grondsanering opnieuw worden geplaatst. De peilbuizen 304, 1010 en 307 konden bij de 2^e bemonsteringsronde niet terug worden gevonden.

5.7.2 Evaluatie

Bij de resultaten van de 1^e bemonsteringsronde valt op dat *Dehalococcoides* wel algemeen in redelijke aantallen aanwezig zijn, maar VC-reductasegenen alleen heel plaatselijk. Dit verklaart de relatief hoge VC-concentraties (figuur 5.6).

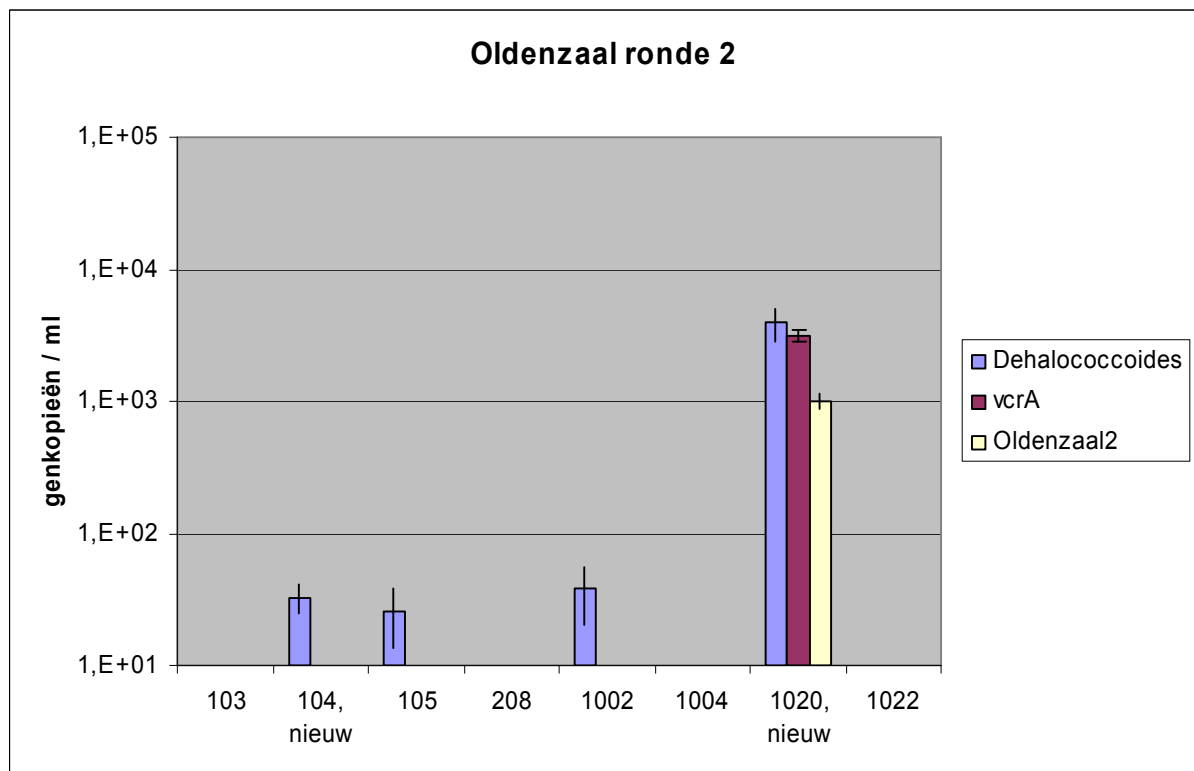
Bij de 2^e bemonsteringsronde zijn de *Dehalococcoides*-aantallen over het algemeen lager (figuur 5.7). De verschillen zijn significant ten opzichte van de nauwkeurigheid van de analyse (zie de discussie in hoofdstuk 6). Duidelijke uitzondering is de stroomafwaarts gelegen peilbuis 1020, maar deze is herplaatst. Hier zijn zowel *Dehalococcoides* als de beide VC-reductasegenen in relatief hoge concentraties aangetroffen.



Figuur 5.6: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis, voorafgaand aan de sanering

In de peilbuizen 103 en 1022, gesitueerd in de directe nabijheid van ontgravingen, zijn alleen in de 2^e meetronde genkopieën van *Dehalococcoides* en *vcrA* aangetroffen (zie bijlage 1), maar omdat inmiddels de detectiegrens was verlaagd en het concentraties onder de vroegere detectiegrens betreft, kan hieruit geen toename worden afgeleid. In de herplaatste peilbuis 104, in de ontgraving, zijn in de 2^e ronde de aantallen genkopieën ten opzichte van de in 1^e ronde aangetroffen *Dehalococcoides*- en *bvcA*-genen juist duidelijk verlaagd.

De sanering lijkt een negatief effect te hebben gehad op de populatie dechlorerende organismen. Daar komt bij dat de natuurlijke capaciteit van de bodem om specifiek VC af te breken voorafgaand aan de sanering al laag was. Uitzondering hierop is de verontreinigingspluim t.p.v. de herplaatste pb 1020, zoals vastgesteld na de sanering. De eerder in kaart gebrachte geochemische condities zijn matig geschikt voor reductieve dechlorering, vooral door aanwezigheid van concurrerende elektronenacceptoren als nitraat en vooral sulfaat. Op basis van deze gegevens is het raadzaam, eventueel na een volgende monitoringsronde specifiek gericht op een actualisatie van de natuurlijke afbraakcondities, actieve stimulering van CKW-afbraak te overwegen. Voor het gesaneerde terrein is bio-augmentatie nodig, maar hiervoor kan gebruik worden gemaakt van grondwater uit de pluim, waar t.p.v. pb 1020 (nieuw) het voor volledige reductieve dechlorering vereiste genetische materiaal is aangetroffen.



Figuur 5.7: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis, een jaar na de sanering

5.8 Locaties Rotterdam

5.8.1 Beschrijving

Voor het ontwikkelen van een gebiedsgerichte aanpak van het verontreinigde Rotterdamse havengebied zijn watervoerende lagen onder bronlocaties onderzocht op de mogelijkheden voor natuurlijke afbraak. Dit betrof een uitgebreid onderzoek dat separaat is uitgevoerd, maar dat voor wat betreft de analyses op VC-reductases is gecombineerd met het onderhavige project.

Ter plaatse van de onderzochte locaties is de bodem opgebouwd uit een antropogene zandlaag (tot 3 à 5 m –mv), een deklaag met afwisselingen van veen en klei en één of twee tussenzandlagen en het 1^e watervoerend pakket vanaf ca. 25 m –mv.

De volgende locaties zijn in het VC-reductase-onderzoek meegenomen:

- het bedrijfsterrein van Akzo Nobel Chemicals BV aan de Welplaatweg in Rotterdam Botlek waar in een fabriek gedurende tientallen jaren VC (vinylchloride) uit 1,2-dichloorethaan (EDC) is geproduceerd. VC kan hier daarom in de bodem zowel aanwezig zijn als uitgangspunt van de verontreiniging en als abiotisch omzettingproduct van EDC, dat in de bodem als puur product in de vorm van een zaklaag aanwezig is. De verontreiniging wordt beheerst door middel van grondwateronttrekking uit het 1^e watervoerende pakket;
- de LBC-locatie is gesitueerd aan de zuidkant van de Nieuwe Maas en bestaat uit voormalig polderland. In de vijftiger jaren is het land opgehoogd om het geschikt te maken als haven-gerelateerd industriegebied. Sinds 1957 is het gebied actief in gebruik voor de opslag en het vershippen van chemicaliën. De bodem is verontreinigd met BTEX en CKW's, die tevens als zaklaag aanwezig zijn, van waaruit nalevering plaatsvindt;
- de Leparoloods is gelegen aan de Theemsweg ten zuiden van de Brittaniëhaven op een terrein dat in het begin van de jaren zestig van de vorige eeuw is opgespoten met een vier tot vijf meter dikke laag bestaande uit zand en baggerspecie. De loods is rond 1968 in gebruik genomen voor de opslag van chemicaliën in transportverpakking. In incidentele gevallen is ook in de loods omgepakt. Ten westen van de loods lag een tankpark met druktanks voor CFK's. In de loop van de tijd heeft de loods een groot aantal stoffen in opslag gelegen waaronder alifatische en aromatische koolwaterstoffen, CFK's, hogere alcohol, alifatische aminen, pigmenten, gewasbestrijdingsmiddelen en weekmakers. De bodem is verontreinigd met CKW's;
- de laatste onderzoekslocatie betreft het westelijke gedeelte van het terrein waarop de Tank Installatie Chemiehaven (TIC) is gevestigd, aan de Welplaatweg 20 (Botlek). TIC is een open overslagbedrijf van vooral vloeibare chemicaliën, zoals acetaten, alcoholen, ketonen, aromaten en vluchtige gechloreerde alifatische koolwaterstoffen. De bodem is verontreinigd met BTEX en CKW's.

Geraadpleegde literatuur:

- vaststelling van de natuurlijke afbraak van diepe verontreinigingen in het havengebied Rotterdam, Deltares/Bioclear, concept, 10 juli 2008;
- assessment and monitoring of 1,2-dichloroethane dechlorination in: Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination (proceedings of the 5th International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium in San Diego, California); Gerritse et al., April 1999
- risicobeheersing op een industriële locatie door biotechnologische in situ maatregelen, Nobis, oktober 2001.

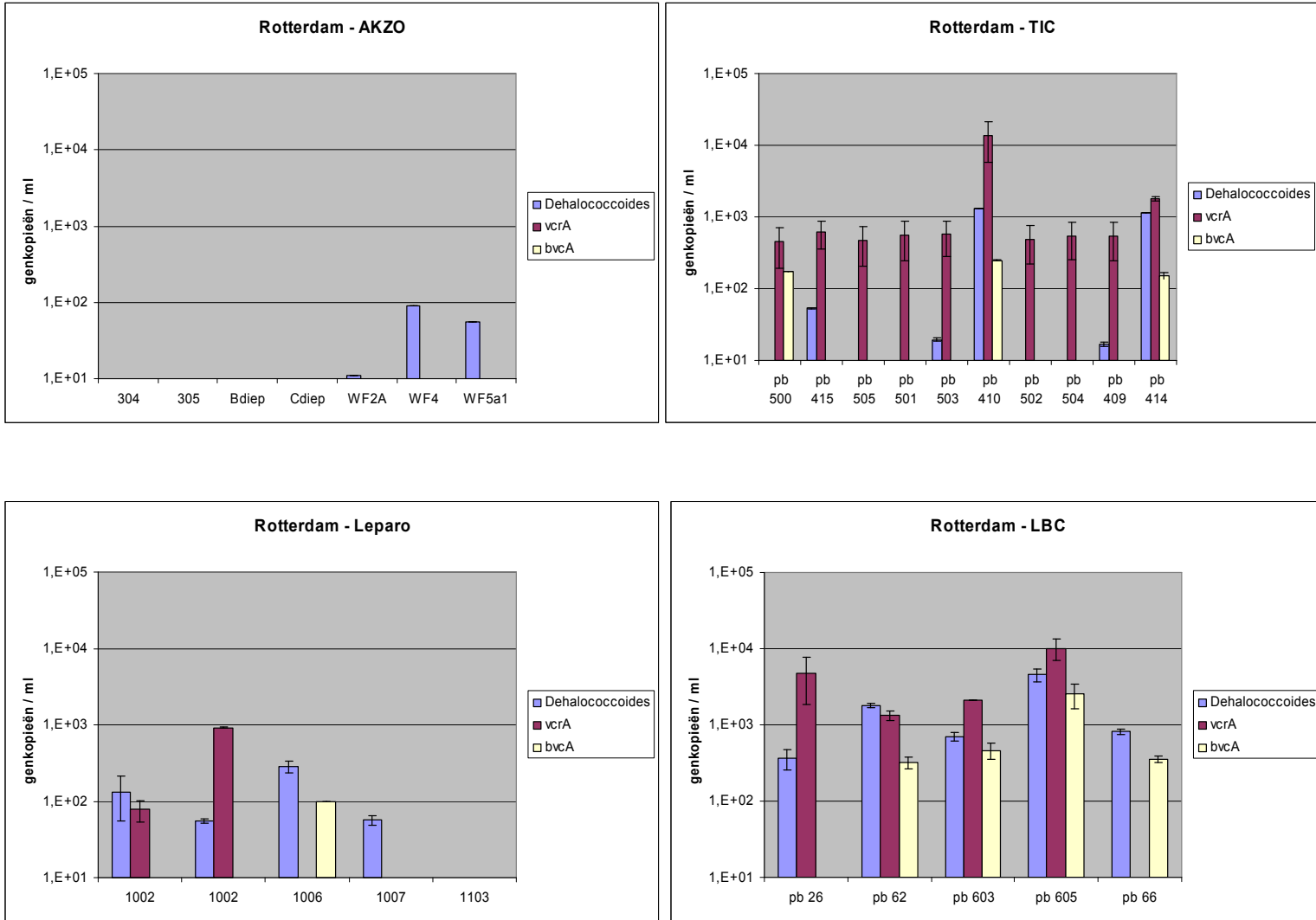
5.8.2 Evaluatie

De resultaten van het onderzoek in Rotterdam zijn binnen een groter project geëvalueerd en gerapporteerd aan het Havenbedrijf Rotterdam. Voor 3 locaties is, op basis van uitgebreid onderzoek waarvan de moleculaire analyses een onderdeel vormen, voor de locaties in het algemeen geconcludeerd dat de condities voor reductieve dechlorering gunstig zijn en dat natuurlijke afbraak van de aanwezige CKW's optreedt.

Op de locatie AKZO is de situatie gecompliceerd: mogelijk is er een tekort aan bruikbare elektronendonor maar anderzijds is voor EDC-afbraak een elektronendonor niet strikt noodzakelijk.

Hier wordt alleen nader ingegaan op de belangrijkste bevindingen betreffende de voor CKW-afbraak relevante moleculaire analyses:

- op de locatie AKZO zijn de resultaten voor wat betreft *Dehalococcoides* en VC-reductasegenen met elkaar in overeenstemming: beide typen genen zijn niet of nauwelijks aangetroffen (figuur 5.8 A). Dat is opmerkelijk omdat de geochemische condities voor reductieve dechlorering redelijk lijken en hoge concentraties etheen zijn gevonden. Dit is te verklaren door reductieve dechlorering van EDC waaruit direct etheen wordt gevormd, zonder dat VC als tussenproduct ontstaat. Dit proces kan ook worden uitgevoerd door andere bacteriesoorten dan *Dehalococcoides*, m.n. *Desulfitobacterium* en *Dehalobacter*. Het aanwezige VC is mogelijk als oorspronkelijke verontreiniging aanwezig. Gezien de afwezigheid van VC-reductases zal dit VC vermoedelijk niet worden afgebroken tot etheen. Door de lage zuurstofconcentraties en het ontbreken van alternatieve elektronenacceptoren als nitraat is ook oxidatieve afbraak van VC niet aannemelijk. Er zijn geen aanwijzingen dat plaatselijke concentratie-afnames van VC te verklaren zijn door afbraak. Overigens dient te worden opgemerkt dat de DNA-analyses op de monsters van deze locatie relatief onnauwkeurig bleken, waarschijnlijk door storende stoffen in het grondwater (zie de discussie in hoofdstuk 6). Dit kan leiden tot een zekere onderschatting van de werkelijke hoeveelheid aanwezige genen op deze locatie. Op basis van de beschreven bevindingen zijn actieve saneringsmaatregelen nodig. Gezien de al redelijke condities voor reductieve dechlorering met relatief weinig organische stof is stimulering van de afbraak door toediening van een elektronendonor aanbevolen. Vanwege de afwezigheid van VC-reductases is het raadzaam dit te combineren met bio-augmentatie, d.m.v. toediening van VC-afbrekende organismen;
- op de locatie LBC komen de resultaten voor wat betreft *Dehalococcoides* en VC-reductasegenen eveneens overeen (figuur 5.8 B). Hier is juist, getuige de aangetroffen genconcentraties, een voor reductieve dechlorering van VC geschikte populatie aanwezig. De geochemische condities zijn goed voor reductieve dechlorering van CKW's, maar juist ongunstig voor de afbraak van de aanwezige BTEX, die zich blijven verspreiden. Er is een duidelijke correlatie met de aanwezigheid van etheen. Dit duidt erop dat het aanwezige VC in de onderzochte diepere delen van de deklaag en het watervoerend pakket wordt omgezet. Probleem blijft echter de nalevering vanuit de zaklaag. Aanbevolen is daarom bovenstrooms de reductieve dechlorering van CKW's te stimuleren en benedenstrooms de oxidatieve afbraak van BTEX;
- ook op de locatie Leparo komen de resultaten voor wat betreft *Dehalococcoides* en VC-reductases redelijk goed overeen (figuur 5.8 C). Hier liggen de aantallen van beide soorten genen aan de lage kant. In overeenstemming hiermee zijn de geochemische condities matig geschikt voor reductieve dechlorering van CKW's (zie met name de EPA-score in bijlage 1). Het eerder waargenomen VC is niet meer aangetroffen en plaatselijk is wel etheen aanwezig. Met het bewijs van capaciteit voor volledige reductieve dechlorering door de aanwezigheid van VC-reductasegenen duiden alle gegevens er op dat het verdwijnen van de verontreiniging in het diepere deel van de deklaag en het watervoerende pakket eerder te verklaren is door biologische afbraak dan door verplaatsing. Actieve saneringsmaatregelen worden daarom niet nodig geacht;
- op de locatie TIC zijn de concentraties *Dehalococcoides* op veel plaatsen laag en vaak niet aantoonbaar, terwijl m.n. één van de beide geanalyseerde VC-reductasegenen (*vcrA*) wel overall aanwezig is (figuur 5.8 D). Op deze locatie leidt de analyse op VC-reductases dus tot een andere conclusie dan de analyse op *Dehalococcoides*. In overeenstemming met de aanwezigheid van VC-reductase zijn de geochemische condities geschikt voor reductieve dechlorering. Actieve saneringsmaatregelen worden daarom voor de CKW's onnodig geacht, maar dat geldt niet voor de BTEX, die zich mogelijk verder zullen verspreiden.



Figuur 5.8: Gemeten concentraties genkopieën per peilbuis

5.9 Advies voor vervolg

Op basis van de resultaten van de analyses op VC-reductasegenen is in combinatie met de overige bekende gegevens voldoende inzicht gekregen in de mogelijkheden van biologische afbraak op alle locaties om een richting aan te kunnen geven hoe verder om te gaan met de verontreiniging. Voor alle locaties is het resulterende advies zeer kort samengevat in tabel 5.1.

Tabel 5.1 Advies maatregelen proeflocaties

Locatie	Monitoren concentraties en processen	+ (plaatselijke) elektronen-donordosering	+ bio-augmentatie
Groningen	x	x	
Nieuw-Weerdinge	x	?	?
Amsterdam	x		
Tilburg gemeente, 4 deellocaties	x	x	x
Tilburg Spoorlocatie	x	x	
Oldenzaal	x	x	
Rotterdam, 4 deellocaties	x	x	x

x geadviseerde maatregel
 ? aanvullend onderzoek nodig

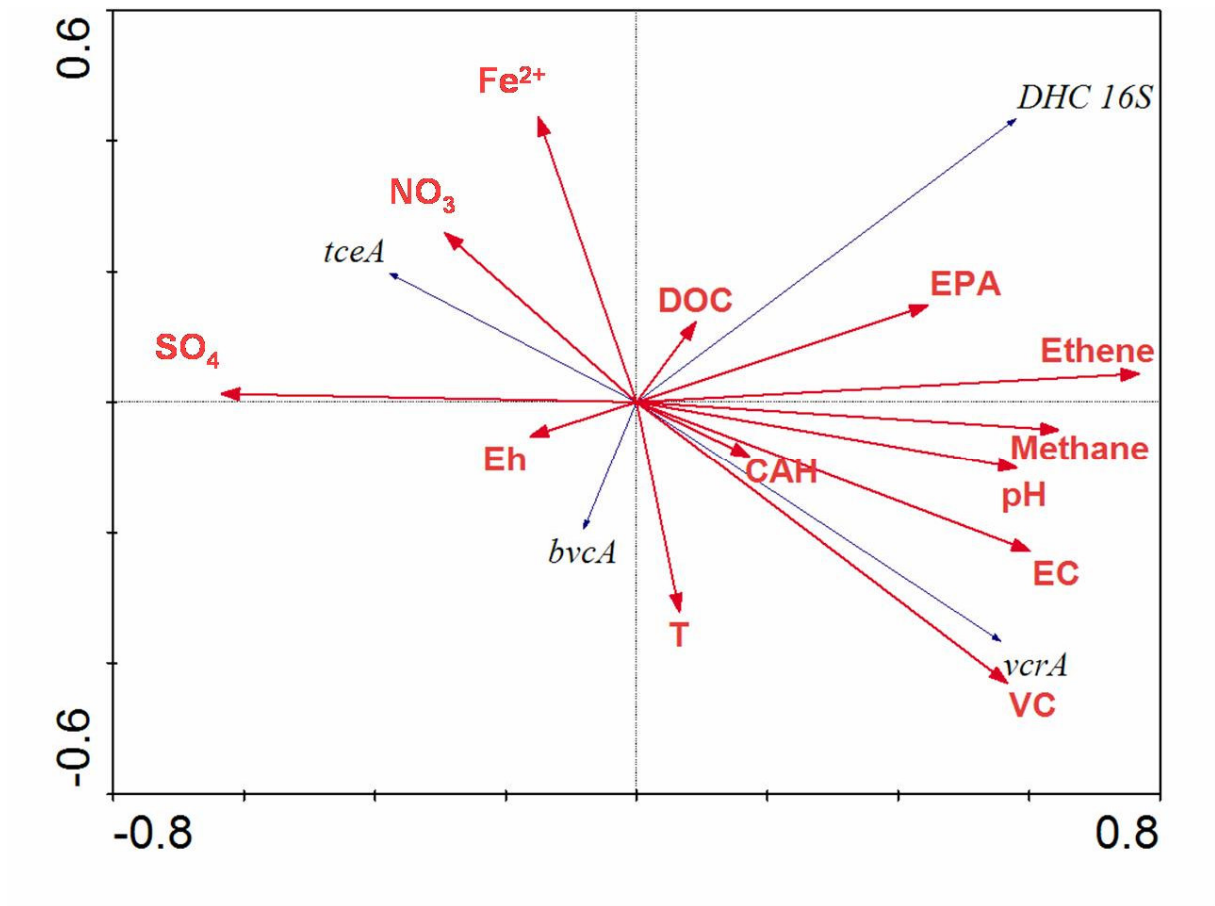
6 Discussie: evaluatie bruikbaarheid analyse op VC-reductases

6.1 Multivariabele statistische analyse

Multivariabele statistische analyse is gebruikt om de invloed van afzonderlijke stof- en geochemische parameters te bepalen op de concentraties van *Dehalococcoides* spp. 16S rRNA-, *vcrA*-, *bvcA*- en *tceA*-genen. Op de in dit project verkregen resultaten van peilbuismonsters waarvoor alle geochemische data beschikbaar zijn, uitgebreid met een selectie monsters van 4 andere locaties, is een redundantieanalyse (RDA) uitgevoerd. In figuur 6.1 zijn de uitkomsten gepresenteerd als vectoren, waarbij de rode vectoren de verklarende en de zwarte de te verklaren parameters weergeven. De hoek tussen 2 vectoren geeft de correlatie tussen de betreffende parameters aan, waarbij een hoek van 180 graden een volledig negatieve correlatie weergeeft. De lengte van de vectoren geeft de mate aan waarin de betreffende parameter bijdraagt aan de verklaring.

Uit de RDA-analyse blijkt dat optimale condities voor VC-reductie verschillen van die voor TRI-reductie en reductieve dechlorering in het algemeen. Door de positieve correlatie tussen enerzijds *tceA* en anderzijds sulfaat, nitraat en ijzer wordt aangetoond dat TRI-afbrekers licht gereduceerde omstandigheden verdragen. Daarentegen zijn VC-reductases negatief gecorreleerd met deze parameters, waaruit blijkt dat VC-afbrekers veel sterker gereduceerde condities nodig hebben. De EPA-score blijkt veel beter de kansen op reductieve dechlorering in het algemeen te kunnen schatten dan de kansen op specifiek VC-reductie. Hetzelfde geldt voor de DOC-concentratie. Logischerwijs is er een sterke correlatie tussen de VC-concentratie en de VC-reductaseconcentratie, al is deze veel sterker voor *vcrA* dan voor *bvcA*. De correlatie met het product etheen is duidelijk minder, hetgeen verklaard kan worden door mobiliteit en omzetting van de stof. De correlatie met geleidbaarheid lijkt sterker, mogelijk door het bij de omzetting vrijkomen van chloride, maar vanwege de – gezien het concentratieniveau – doorgaans beperkte bijdrage van reductieve CKW-dechlorering aan het geleidingsvermogen kan dit toeval zijn. Verder is de geringe samenhang tussen *vcrA*- en *bvcA*-concentraties interessant. Dit duidt er, in overeenstemming met literatuurgegevens, op dat de beide enzymen niet in dezelfde organismen aanwezig zijn.

Samenvattend toont figuur 6.1, met vectoren voor een scala aan chemische en biologische parameters die uiteenlopende kanten op wijzen en niet geheel samenvallen met die van de VC-reductases, dat andere indicatoren niet specifiek genoeg zijn voor het inschatten van VC-reductiecapaciteit; zie verder § 6.3 en § 6.4.



Figuur 6.1: Resultaten RDA-analyse voor bepaling invloed afzonderlijke stof- en geochemische parameters op concentraties *Dehalococcoides* spp. 16S rRNA- (DHC), *vcrA*-, *bvcA*- en *tceA*-genen. EPA = EPA score; methane = methaanconcentratie; T = temperatuur; pH = pH; EC = geleidbaarheid; VC = vinylchloride concentratie; CAH = totale concentratie van PER, TRI, CIS en VC; ethene = etheenconcentratie; SO₄ = sulfaat; NO₃ = nitraat; DOC = opgelost organisch koolstof; Eh = redoxpotentiaal; Fe = is concentratie ijzer (totaal/tweewaardig).

6.2 Volledigheid van de analyse

De volgende resultaten wijzen er op dat andere, onbekende VC-reductases geen belangrijke rol spelen bij VC-dechlorering op de tot nu toe onderzochte locaties:

- met de nieuwe primerparen voor een totaalanalyse van VC-reductases (gebaseerd op de overeenkomsten tussen de bekende VC-reductasegenen) werd alleen DNA-materiaal gevormd dat overeenkomt met de *vcrA*- en *bvcA*-genen;
- met het nieuw ontwikkelde primerpaar P1P5 zijn in grondwatermonsters van de proeflocaties en in batches totale concentraties aan VC-reductases aangetoond die ruwweg in dezelfde orde van grootte liggen als voor de afzonderlijk bepaalde *vcrA* en *bvcA*-genconcentraties opgeteld;
- op de tot dusver onderzochte locaties correspondeert afbraak van VC altijd met de aanwezigheid van *vcrA*- en/of *bvcA*-genen;
- in alle VC-dechlorerende batchcultures werden hoge concentraties *vcrA*- en/of *bvcA*-genen gevormd. VC-dechlorerende batches zonder deze genen, m.a.w. met onbekende VC-reductase(s), zijn niet verkregen.

6.3 Toegevoegde waarde ten opzichte van chemische indicatoren

Uit hoofdstuk 5 blijkt dat de resultaten van de analyse op VC-reductasegenen globaal wel in lijn zijn met de “traditionele” indicatoren voor biologische afbraak van CKW's via reductieve dechlorering en meestal niet tot radicaal andere conclusies leiden. Zo is er een vrij goede correlatie met de waarden voor geochemische parameters die duiden op gereduceerde condities. De correlatie met het product van reductieve VC-dechlorering, etheen, is minder. Zo is op een aantal plaatsen wel etheen aanwezig, maar zijn geen VC-reductasegenen aangetroffen. Dit kan verschillende oorzaken hebben; etheen kan:

- uit een ander proces zijn gevormd (bijvoorbeeld uit 1,2-dichloorethaan, zoals waarschijnlijk gebeurt op proeflocatie Rotterdam-Akzo);
- in het verleden zijn gevormd;
- stroomopwaarts zijn gevormd.

Opmerkelijk is dat de aanwezigheid van relatief hoge concentraties sulfaat, dat als concurrerende elektronendonator fungeert, dikwijls geen beletsel is voor de aanwezigheid van VC-reductasegenen en etheen. Dit blijkt uit de bevindingen op de proeflocaties Groningen, Nieuw-Weerdinge, Amsterdam en Tilburg Spoorlocatie. Toch is gebleken uit onderzoek dat vooral het verwijderen van de laatste chlooratomen van gechlorideerde ethenen sterk gereduceerde condities vereist. Een verklaring is dat zowel de VC-reductases als etheen van stroomopwaarts afkomstig zijn. Aannemelijker is dat sulfaat en reductieve dechlorering van VC op ogenschijnlijk dezelfde plaats kunnen voorkomen als gevolg van de heterogeniteit van de bodem op kleine schaal: sulfaat kan bijvoorbeeld geconcentreerd zijn in macroporiën, terwijl de VC-afbrekende organismen zich in microporiën bevinden. Bepaling van welke van deze verklaring(en) de juiste is (zijn), zal altijd in samenhang met een beschouwing van het concentratieverloop van alle relevante parameters in ruimte en tijd moeten plaatsvinden.

6.4 Toegevoegde waarde ten opzichte van biologische indicatoren

Belangrijk is de bevinding dat de aanwezigheid van *Dehalococcoides* niet altijd gepaard gaat met het vóórkomen van VC-reductasegenen en omgekeerd. De duidelijkste voorbeelden zijn figuur 5.6, waar bij de eerste monitoringsronde in Oldenzaal in de meeste peilbuizen *Dehalococcoides*16S rRNA- maar geen VC-reductasegenen zijn aangetroffen en figuur 5.8 waar op Rotterdam-TIC in de meeste peilbuizen VC-reductasegenen maar geen *Dehalococcoides*genen zijn aangetroffen. In Oldenzaal zijn dus wel dechlorerende organismen aanwezig maar niet die welke de laatste dechloreringsstap kunnen uitvoeren. Op Rotterdam-TIC lijken nog ongeïdentificeerde organismen in staat te zijn tot de laatste dechloreringsstap. Dit kunnen soorten zijn die niet tot het genus *Dehalococcoides* spp. behoren of soorten die daar wel onder vallen maar met de huidige analyse op *Dehalococcoides*-16SrDNA-genen niet kunnen worden herkend. In de wetenschappelijke literatuur zijn voor laatstgenoemde verklaring het laatste jaar steeds meer aanwijzingen te vinden: de *Dehalococcoides*-groep is mogelijk groter dan gedacht. Deze voorbeelden illustreren dat de *Dehalococcoides*-analyse alleen onvoldoende zekerheid biedt dat op een bepaalde plaats in een bepaalde bodemlaag volledige dechlorering wel, of juist niet, kan plaatsvinden. Dit is met name van belang voor VC-pluimen, waarin voor een stabiele eindsituatie verdere omzetting noodzakelijk is.

De beperkte samenhang van tceA-concentraties met *Dehalococcoides*- en VC-reductasegenenconcentraties zou reden kunnen zijn ook deze parameter mee te nemen bij locatie-karakterisatie en monitoring. Echter, meestal zal de aan- of afwezigheid van de afbraakproducten CIS en VC al voldoende bewijs leveren voor het al of niet plaatsvinden van deze omzetting.

6.5 Toepassingswijze

De resultaten bevestigen de veronderstelling dat vóórkomen en concentratie van VC-reductasegenen, net als van *Dehalococcoides* en geochemische parameters, op locaties van plaats tot plaats en tussen bodemlagen sterk variëren. Algemene conclusies over volledige biologische afbraak kunnen daarom nooit worden getrokken op basis van de analyse van slechts enkele monsters. Altijd zijn voldoende monsters nodig die ruimtelijk goed verdeeld moeten zijn over het verontreinigde gebied en alle verontreinigde bodemlagen.

De aanwezigheid van VC-reductasegenen verschaft bewijs dat capaciteit om VC af te breken beschikbaar is, maar geeft nog geen zekerheid dat VC-reductase ook daadwerkelijk wordt ingezet door micro-organismen. De op de proeflocaties gevonden samenhang met andere indicatoren duidt erop dat op dezelfde plaatsen inderdaad VC-afbraak plaatsvindt. Helemaal zeker is dat door de grondwaterbeweging in het complexe bodemsysteem niet. Door een gedegen analyse van het concentratieverloop voor alle relevante parameters in ruimte en tijd zijn toch eenduidige conclusies mogelijk, zoals voor de proeflocaties is gedemonstreerd. Als bij monitoring een duidelijke toename van VC-reductasegenenconcentraties wordt aangetoond is het bewijs vrijwel geleverd dat daadwerkelijk VC-reductases worden aangemaakt voor de omzetting van VC. Bij de shock-load sanering in IJlst (SKB-project PT 5400) kon gestimuleerde dechlorering overtuigend worden gekoppeld aan toename van VC-reductase: zie § 7.6 van het eindrapport en het bijbehorende artikel op www.skbodem.nl.

Belangrijk is de bevinding dat in veel peilbuizen slechts één van beide VC-reductases aanwezig blijkt te zijn. Zelfs zijn er 2 locaties waarbij in alle onderzochte peilbuizen maar één VC-reductase is aangetroffen: *bvcA* in Nieuw Weerdinge (zie figuur 5.2) en *vcrA* op Spoorlocatie Tilburg SBNS (zie figuur 5.5). Dit maakt analyse op beide reductases noodzakelijk.

In dit project is een nieuwe combinatie-analyse voor beide VC-reductasegenen ontwikkeld, die bij grotere aantallen monsters tot een kostenbesparing kan leiden. Deze totaalanalyse voor VC-reductasegenen kent wel een hogere detectielimiet en is daarom met name geschikt bij gestimuleerde biologische afbraak, waarbij relatief hoge concentraties mogen worden verwacht. De detectielimiet kan daarbij enigszins worden verlaagd door grotere monstervolumes (van een aantal liters) te hanteren.

6.6 Betrouwbaarheid van de analyse

Uit hoofdstuk 4 blijkt dat de kwantitatieve detectie van twee VC-reductasegenen, *vcrA* en *bvcA* een betrouwbaar en compleet beeld geeft van VC-dechloreringscapaciteit. Uit de in de figuren in hoofdstuk 5 weergegeven foutbalken blijkt dat de variatie in analyseresultaten niet groot is. De variatiecoëfficiënt van de calibratielijnen van de uitgevoerde analyses bedroeg 0,09% voor *Dehalococcoides* 16S rDNA), 0,27% voor *vcrA* en 0,09% voor *bvcA*. Dit betekent dat de real-time PCR-analyses zeer reproduceerbaar zijn uitgevoerd. De variatiecoëfficiënt van de uitgevoerde analyses van de veldmonsters bedroeg respectievelijk: 48%, 56% en 32%. Dit betekent dat monsternamen en voorbehandeling de grootste variatie veroorzaken. Aangezien voor het doel van deze analyses alleen ordes van grootte van belang zijn (bevat het grondwater 100, 1.000, 10.000 of 100.000 organismen per ml?) kan het hele traject van monsternamen, voorbehandeling en analyse als voldoende nauwkeurig worden gekarakteriseerd. Derhalve kunnen resultaten van verschillende ronden met elkaar worden vergeleken.

Door de specificiteit van de gebruikte methode zijn vals negatieve en vals positieve resultaten onwaarschijnlijk. Dit kan worden geverifieerd door duplobepalingen. Genoemde getallen zijn overigens gebaseerd op de analyses van dit project die in hetzelfde laboratorium en met dezelfde apparatuur uitgevoerd. Structurele verschillen in analyseresultaten tussen laboratoria zijn bij deze nieuwe analyse zeker denkbaar.

Voor kwantitatieve PCR is kwaliteit en reproduceerbaarheid van DNA-isolatie essentieel. Daarom is ervoor gekozen om voor alle monsters dezelfde DNA-isolatiemethode te gebruiken (BIO101 soil Kit), waar goede ervaringen mee zijn. De kwaliteit van het verkregen DNA wordt eerst getest met een algemene PCR van het totale bacteriële 16S rDNA. Storende factoren zoals humuszuren en lage pH kunnen opbrengst en kwaliteit van het geïsoleerde DNA echter verminderen. Vaak is in dat geval verdunning van het geïsoleerde DNA voldoende effectief om toch een goede PCR-reactie uit te kunnen voeren. In monsters met relatief weinig DNA en veel storende factoren kan het voorkomen dat een PCR uiteindelijk toch niet goed lukt. In dit project was dat alleen bij de monsters van locatie Rotterdam-Akzo het geval. In zo'n geval zou gekozen kunnen worden voor een andere, meer bewerkelijke DNA-isolatiemethode. Omdat dat een eenduidige vergelijking met op de gebruikelijke wijze verkregen resultaten moeilijk maakt, is dat niet gedaan.

6.7 Nadere discussie

In bijlage 2 wordt in het bijbehorende wetenschappelijk artikel, waarin gebruik is gemaakt van de in dit project verzamelde data waaraan de data van 4 andere locaties zijn toegevoegd, op de discussie in dit hoofdstuk nog nader ingegaan.

7 Conclusies en aanbevelingen

De volgende conclusies kunnen worden getrokken:

- De genen kenmerkend voor *Dehalococcoides* bacteriën (16S rRNA genen) en VC-reductases worden vaak gezamenlijk aangetroffen; maar niet altijd.
- In ca. 20 % van de onderzochte grondwatermonsters (op de SKB-locaties en 4 additionele locaties waarin *Dehalococcoides* gedetecteerd zijn) werden geen VC-reductasegenen aangetroffen. Dat betekent dat bij analyse op alleen *Dehalococcoides* onterecht de conclusie kan worden getrokken dat op bepaalde plaatsen in bepaalde bodemlagen volledige dechlorering tot etheen zal optreden.
- In ca. 5% van de onderzochte grondwatermonsters (op de SKB-locaties en 4 additionele locaties) zijn wel VC-reductasegenen aangetroffen, maar geen *Dehalococcoides*. De aantallen VC-reductasegenen zijn vaak groter of gelijk aan de aantallen *Dehalococcoides* 16S rRNA-genen. Een verklaring voor beide waarnemingen is dat micro-organismen aanwezig zijn die wel VC-reductases bezitten, maar niet als *Dehalococcoides* worden gedetecteerd, of dat er meer VC-reductase genen dan 16S rRNAgenen in één *Dehalococcoides*-bacterie aanwezig kunnen zijn. Bij analyse op alleen *Dehalococcoides* kan dus onterecht de conclusie worden getrokken dat geen VC-dechloreringscapaciteit aanwezig is.
- Er zijn naast *vcrA* en *bvcA* geen andere onbekende VC-reductase-genen gevonden. Analyse op deze VC-reductase-genen is daarom toereikend om vast te stellen of de capaciteit aanwezig is om VC te dechloreren.
- De VC-reductase-genen *vcrA* en *bvcA* zijn zowel gezamenlijk als afzonderlijk aangetroffen. Daarom is het, om vast te stellen of VC-dechloreringscapaciteit aanwezig is, belangrijk altijd op beide te analyseren.
- Een combinatie-analyse om beide VC-reductase-genen gezamenlijk (in één assay) te kwantificeren is succesvol ontwikkeld. Deze heeft voorsnog een hogere detectiegrens dan de afzonderlijke analyse op *vcrA* en *bvcA* en is daarom alleen geschikt als relatief hoge concentraties kunnen worden verwacht. Omdat de combinatiemethode slechts 2 afzonderlijke DNA-analyses blijkt te vervangen, zal het financiële voordeel pas bij grotere aantallen (tientallen) monsters significant zijn.
- Voor VC-afbraak zijn sterker gereduceerde condities nodig dan voor CKW-afbraak in het algemeen. Desondanks blijken relatief hoge concentraties van alternatieve elektronenacceptoren als nitraat en sulfaat het voorkomen van VC-reductasen niet altijd in de weg te staan, waarschijnlijk door de heterogeniteit van de bodem op zeer kleine schaal.
- Bestaande indicatoren zoals redoxparameters, EPA-score of etheenconcentratie vertonen onvoldoende correlatie met VC-reductasegenenconcentraties om de aan- of afwezigheid van VC-afbraakcapaciteit goed vast te stellen.

Slotconclusie is dat analyse op VC-reductasegenen een belangrijke toegevoegde waarde kan hebben in vrijwel de gehele bodemonderzoeks- en saneringsketen. Bij de locatie-karakterisatie zal het een additionele parameter moeten worden, die analyses op CKW's, omzettingsproducten daarvan, geochemische parameters en ook moleculaire analyses op *Dehalococcoides* niet kan vervangen. Op plaatsen waar de hoger gechlorideerde CKW's al zijn omgezet en overwegend nog VC aanwezig is, is dit echter, naast de VC- en etheenconcentraties, de belangrijkste parameter.

Bij monitoring van NA en voor sturing van saneringen is het daarom wel denkbaar dat op bepaalde tijdstippen en op bepaalde plaatsen alleen op VC en VC-reductases wordt geanalyseerd. Gezien het veelvuldig voorkomen van grote VC-pluimen in watervoerende lagen ligt brede toepassing van de moleculaire analyse op VC-reductases in de nabije toekomst voor de hand.

Op basis van bovenstaande conclusies wordt (adviseurs van) probleemeigenaars aanbevolen in gevallen van CKW-verontreinigingen waarin VC kan vóórkomen, analyse op de beide VC-reductasegenen mee te nemen bij:

- het nader onderzoek om de toekomstige risico's t.a.v. verspreiding en uitdamping van VC zo goed mogelijk in te kunnen schatten;
- het saneringsonderzoek als onderdeel van de karakterisatie van bodemcondities (parameters als redoxcondities, organische stof, nutriënten, omzettingsproducten) voor het uitwerken van (betaalbare) biologische saneringsvarianten;
- het opstellen van het saneringsplan om te treffen biologische saneringsmaatregelen optimaal te dimensioneren met effectief gebruik van VC-reducerende zones;
- het uitvoeren van de sanering voor het efficiënt plannen van (biologische) saneringsactiviteiten, als onderdeel van monitoring (met voor zover nodig tevens redoxcondities, organische stof, nutriënten en omzettingsproducten) die inzicht verschaft in ruimtelijke verdeling en ontwikkeling in de tijd van omzettingcapaciteit voor VC. Vooral in het geval van stimulering van reductieve dechlorering, waarbij relatief hoge genenconcentraties worden verwacht en relatief grote aantallen monsters moeten worden geanalyseerd is het mogelijk de ontwikkelde totaalanalyse voor VC-reductasegenen te gebruiken;
- het afronden van een sanering met restverontreinigingen van VC, als daarmee aannemelijk kan worden gemaakt dat deze geen onacceptabele risico's meer opleveren en uiteindelijk zullen verdwijnen.

Het bevoegd gezag kan analyse op VC-reductasegenen eisen in geval met de standaardmatige parameters onvoldoende zekerheid wordt geboden op volledige afbraak. Alvorens deze analyse in bepaalde situaties te verplichten, is het raadzaam een "ringonderzoek" te verrichten bij de verschillende laboratoria die deze analyses uitvoeren (zoals ook gebruikelijk is voor chemische analyses) om inzicht te verkrijgen in eventuele structurele verschillen tussen laboratoria. Op dit moment is hierover niets bekend.

Gezien de in dit project aangetoonde toegevoegde waarde van VC-reductasedetectie voor de aanpak van chloorethenenverontreinigingen wordt met name de overheid geadviseerd deze lijn door te trekken en te investeren in de ontwikkeling en het toepasbaar maken van detectie van functionele genen die relevant zijn voor andere veelvoorkomende verontreinigingen.

Bijlage 1

Analysegegevens

	Peilbuis	Diepte (m)	Algemeen Situering	Datum monsternamen
Groningen	WD1		18 kern, 1e wvp	28-2-2008
	WD2		18 pluim, 1e wvp	28-2-2008
	DB02		18 kern, 1e wvp	28-2-2008
	100m		20 omgeving kern, 1e wvp	28-2-2008
	100m		40 omgeving kern, 2e wvp	28-2-2008
	100m		61 omgeving kern, 2e wvp	28-2-2008
	100m		100 omgeving kern, 3e wvp	28-2-2008
	403		11 pluim, 1e wvp	28-2-2008
	403		7 pluim, deklaag	28-2-2008
	404		7 kern, deklaag	28-2-2008
	1001		3 kern, deklaag	28-2-2008
	1014		3 omgeving kern, deklaag	28-2-2008
Nieuw-Weerdinge	mf15		27 oostelijke pluim	16-11-2007
	db1		41 oostelijke pluim	16-11-2007
	db1		33 oostelijke pluim	16-11-2007
	dw4		32 eind noordelijke pluim	16-11-2007
	db3		24 noordelijke pluim	16-11-2007
	db3		34 noordelijke pluim	16-11-2007
	dw3		24 tussen de pluimen	16-11-2007
	db2		34 noordelijke pluim	16-11-2007
	db2		24 noordelijke pluim	16-11-2007
Amsterdam	pb 113		3 Stroomafwaarts, ophooglaag	22-11-2007
	pb 254		3 Pluim, ophooglaag	22-11-2007
	pb 420		4 Pluim, ophooglaag	22-11-2007
	pb 421		5 Pluim, ophooglaag	22-11-2007
	pb 472		5 Gesaneerde bron, ophooglaag	22-11-2007
	pb 473		5 Gesaneerde bron, ophooglaag	22-11-2007
	pb 475		5 Pluim, ophooglaag	22-11-2007
	pb 476		10 Gesaneerde bron, deklaag	22-11-2007
	pb 502		9 Stroomafwaarts, deklaag	22-11-2007
	pb 4190		4 Pluim, ophooglaag	22-11-2007
	pb 5090		10 Gesaneerde bron, deklaag	22-11-2007
	pb 5101		7 Stroomopwaarts, deklaag	22-11-2007
	Tilburg	54		4 Vormenfabriek, bron
219			8 Vormenfabriek, pluim	11-2-2008
313A			19 Vormenfabriek, pluim	11-2-2008
R501			30 Regenboog, pluim	11-2-2008
R502			30 Regenboog, pluim	11-2-2008
R508			20 Regenboog, bron	11-2-2008
R401			20 Regenboog, pluim	11-2-2008
H145-1			12 Havendijk, pluim	11-2-2008
H144-1			8 Havendijk, pluim	11-2-2008
B3			6 Bosscheweg, bron	11-2-2008
B230			15 Bosscheweg, pluim	11-2-2008
B231			25 Bosscheweg, pluim	11-2-2008
Spoorlocatie SBNS		RH 05-049		20 restverontreiniging middeldiep
	RH 05-026		11 restverontreiniging middeldiep	19-2-2008
	RH 05-040		11 restverontreiniging middeldiep	19-2-2008
	RH 05-023		11 restverontreiniging middeldiep	19-2-2008
	RH05-022		11 restverontreiniging middeldiep	19-2-2008
	RH 05-021		20 restverontreiniging middeldiep	19-2-2008
	1021		12 restverontreiniging middeldiep	19-2-2008

	511	24 restverontreiniging diep	19-2-2008
	R48	12 restverontreiniging middeldiep	19-2-2008
	R50	25 restverontreiniging diep	19-2-2008
Oldenzaal	103	4 begin pluim, tot in kleilaag	28-9-2007
	104	3 bron, tot in kleilaag	28-9-2007
	105	3 afzonderlijk vlek, tot in kleilaag	28-9-2007
	208	2 referentie, buiten locatie	28-9-2007
	304	2 nabij bron, tot in kleilaag	28-9-2007
	307	6 nabij bron, 2e zandlaag	28-9-2007
	1002	3 eind pluim	28-9-2007
	1004	3 buiten pluim	28-9-2007
	1010	3 bron, 1e en 2e zandlaag	28-9-2007
	1020	3 eind pluim, tot in kleilaag	28-9-2007
	1022	3 stroomopwaarts, 2e zandlaag	28-9-2007
	103	4 begin pluim, tot in kleilaag	25-11-2008
	104, nieuw	3 bron, tot in kleilaag	25-11-2008
	105	3 afzonderlijk vlek, tot in kleilaag	25-11-2008
	208	2 referentie, buiten locatie	25-11-2008
	304	2 niet meer aangetroffen	25-11-2008
	307	6 niet meer aangetroffen	25-11-2008
	1002	3 eind pluim	25-11-2008
	1004	3 buiten pluim	25-11-2008
	1010	3 niet meer aangetroffen	25-11-2008
	1020, nieuw	2 eind pluim, tot in kleilaag	25-11-2008
	1022	3 stroomopwaarts, 2e zandlaag	25-11-2008
LBC	pb 26	20 bron, tussenzandlaag	4-10-2007
	pb 62	25 bron, onderkant deklaag	4-10-2007
	pb 603	25 pluim, onderkant deklaag	4-10-2007
	pb 605	25 pluim, onderkant deklaag	4-10-2007
	pb 66	32 pluim, 1e wvp	4-10-2007
TIC	pb 500	32 1e wvp	18-10-2007
	pb 415	31 1e wvp	18-10-2007
	pb 505	32 1e wvp	18-10-2007
	pb 501	32 1e wvp	18-10-2007
	pb 503	32 1e wvp	18-10-2007
	pb 410	23 tussenzandlaag	18-10-2007
	pb 502	32 1e wvp	18-10-2007
	pb 504	32 1e wvp	18-10-2007
	pb 409	22 tussenzandlaag	18-10-2007
	pb 414	31 1e wvp	18-10-2007
AKZO	304	30 bron, 1e wvp	3-1-2008
	305	31 bron/pluim, 1e wvp	3-1-2008
	Bdiep	31 pluim, 1e wvp	3-1-2008
	Cdiep	31 pluim, 1e wvp	3-1-2008
	WF2A	26 bron, 1e wvp	3-1-2008
	WF4C	33 pluim, 1e wvp	3-1-2008
	WF5a1	29 pluim, 1e wvp	3-1-2008
Leparo	1002	13 bron, tussenzandlaag	8-1-2008
	1002	22 bron, slecht doorlatende laag	8-1-2008
	1006	27 pluim, 1e wvp	8-1-2008
	1007	11 bron, tussenzandlaag	8-1-2008
	1103	13 referentie, tussenzandlaag	8-1-2008

Blanco: geen meetgegevens (bij veldmetingen wegens te weinig grondwatertoestroming)

<<: waarde beneden detectiegrens

Voor DNA-analyses: De exacte detectiegrens is afhankelijk van gerealiseerde filtratievolumes.

Indien goed reproduceerbare resultaten werden verkregen zijn ook waarden onder de elders genoemde detectiegrenzen meegenomen

N.B. Door aanpassing van de analysemethode zijn de detectiegrenzen in de loop van de tijd gewijzigd.

Cursief weergegeven: historische data uit eerder onderzoek

Indicatorwaarde gunstige condities voor VC-afbraak

Indicatorwaarde twijfelachtige condities voor VC-afbraak

Indicatorwaarde ongunstig condities voor VC-afbraak

temp (°C)	[H2] (nM)	Fysisch/chemisch						
		pH	Eh (mV)	EC (µS/cm)	O2 (mg/l)	DOC (mg/l)	Fe (mg/l)	Dehalococci copies/ml
12,4		6,9	-132	1220	0,1	6,5	3,5	<10
12		6,9	-124	940	0,1	4,1	4,5	8,85E+01
12		6,8	-110	1360	0,1	5,5	5,3	<10
11,9		6,8	-86	1580	0,0	23	1,4	1,34E+03
11,4		7,1	-178	2970	0,0	41	21	6,63E+04
11,4		7,0	-168	2680	0,0	5,5	21	2,44E+03
11,4		7,1	-178	1140	0,0	6,2	9,1	4,83E+01
12,6		6,8	-99	1320	0,1	8,3	2,4	<10
12,3		7,3	-135	983		14	2,6	1,75E+04
13,0		6,7	-103	1190	0,1	16	1,2	9,63E+01
10,5		7,1	-182	773	0,1	14	0,34	2,15E+01
10,1		6,9	-172	971	0,1	21	33	5,60E+01
12,1		5,8	-16	363	0,0			<10
11,5		6,0	-17	448	0,1	16	22	<10
11,4		5,8	-11	448	0,1			<10
10,6		6,0	31	501	5,1			8,12E+01
11,8		6,1	-18	423	0,1			2,77E+02
11,2		6,2	-22	417	0,1			4,62E+01
11,5		6,2	-33	430	0,1			<10
11,7		5,9	-12	489	0,1	30	39	1,74E+02
11,5		6,3	-43	450	0,1	54	15	5,61E+02
12,7		7,2	-130	835	0,0	31	9	7,74E+01
13,1		7,0	-119	860	0,0			2,23E+02
13,7		6,7	-106	2160				6,00E+02
13,3		6,6	-85	2330	0,0			1,53E+03
15,1		6,7	-110	1670	0,0			4,54E+01
14,9		6,9	-143	2660	0,0	35		1,05E+02
11,8		7,0	-103	2750	1,0	26		2,71E+01
13,1		6,8	-109	1970	0,0	47	1,9	<10
12,5		6,8	-88	4630	0,0			1,57E+02
12,9		6,8	-59	1570	1,7			7,61E+03
13,2		6,9	-88	3556	0,0			3,15E+02
14,7		7,0	-109	1970	0,0	9,4	0,1	3,58E+02
15,4		5,1	208	653	0,1	4,6	0,1	<10
11,7		6,6	-80	100	0,1	2,5	2,6	7,99E+02
12,6		5,7	-18	376		3,4	3,7	<10
12,8		5,7	13	6,69	0,1	3,1	19,0	<10
12,6		5,5	-2	569	0,2	3,5	9,2	<10
12,9		5,1	-79	454	0,3	6,2	3,6	<10
13,1		5,5	-34	434	0,2	3,2	4,8	<10
14,4		5,7	85	436	0,0	11	<0,02	<10
14,3		5,7	138	566	0,2	15	0,03	3,50E+01
10,1		6,1	-139	347	0,1	8,4	0,03	1,24E+02
11,3		5,8	106	360	0,1	4,9	1,3	1,21E+02
11,1		5,4	56	339	0,0	3,1	5,4	<10
13,0		5,4	32	572	0,1	<5	0,3	<10
12,6		5,3	94	556	0,1	<5	0,5	1,55E+01
12,2		6,2	-66	483	0,1	<5	1,6	<10
13,8		6,1	47	991	0,6	6,1	1,4	3,30E+01
13,3		5,8	-13	472	0,2	5,9	1,3	<10
12,3		5,8	-32	526	0,1	<5	2,9	<10
13,1		5,5	-27	359	0,1	48	120	7,80E+01

12,4		5,7	6	631	0,0	<5	2,9	2,07E+02
13,1		5,5	27	1310	0,2	<5	5	6,13E+02
13,9		5,7	-4	698	0,2	6,5	0,4	1,60E+01
15,1		6,1	48	605	0,1	34	0,5	<10
14,7		5,8	95	485	0,0	33	0,2	7,19E+02
16,2		6,0	59	630	0,0	9,8	0,3	2,47E+02
16,8		6,4	-22	407	0,1			3,06E+02
14,9		6,1	39	382	2,0			1,63E+03
								1,77E+03
16,5		6,0	86	685	0,0			8,63E+02
17,5		6,0	95	508	0,0			<10
15,5		5,9	40	589	0,1			8,04E+01
15,7		6,1	68	535	2,0			1,16E+02
17		5,8	47	635	0,1	41	0,6	<10
12,9		6,1	43	425	0,2			6,22E+00
10,4		6,4	8	347				3,29E+01
11,0		6,1	119	419	0,2			2,58E+01
10,1		6,6	-32	233	0,1			<3
11,1		6,0	141	331	0,4			3,81E+01
10,5		6,1	148	359	0,5			<3
10,3		6,0	25	393	1,6			3,92E+03
14,1		5,8	25	463	0,0			7,23E+00
12,5	2,8	6,5	-120	2590	0,4	29	0,02	3,67E+02
12,8	1,8	6,6	-115	3170	0,6	26	0,02	1,80E+03
13,5	0,1	6,7	-104	1810	0,1	110	0,02	7,07E+02
12,9	0,1	6,6	-101	2230	0,0	17	0,02	4,58E+03
12,8	3,7	6,7	-70	2940	0,2	97	0,02	8,22E+02
13,3	1,5	6,7	-70	2200	0,3	16	0,01	<10
12,9	2,2	6,7	-119	2220	0,1	19	0,02	5,31E+01
13,7	1,7	6,9	-130	2530	0,1	36	0,01	<10
14,9	1,1	6,7	-115	2470	0,2	17	0,02	<10
14	2,0	6,9	-133	2700	0,2	39	0,01	1,95E+01
14,4	7,4	6,7	-93	2490	1,2	30	0,02	1,33E+03
13,6	4,9	6,7	-128	2770	0,2	20	0,02	<10
15,1	14,5	6,8	-133	2650	0,2	36	0,01	<10
13,2	1,5	6,7	-124	2670	0,3	20	0,02	1,69E+01
13,6	1,0	6,7	-103	3000	0,3	21	0,01	1,16E+03
13	0,1	6,7	-161	508	1,4	30	0,47	<10
8,7	0,2	6,7	-153	468	0,1	19	0,49	<10
9	0,1	6,8	-145	1090,0	0,1	15	0,14	<10
8,5	0,4	6,8	-156	1560	0,1	13		<10
12,9	0,1	6,6	-141	527	0,7	16	0,25	1,11E+01
8	0,4	6,9	-158	374	0,7	19	0,42	9,08E+01
9,7	0,2	6,7	-127	476	1,4	21		5,60E+01
10,2	0,5	6,7	-141	1090	0,1	9,6		1,33E+02
11	0,2	6,7	-179	6480	0,4	51		5,51E+01
11	0,7	6,7	-135	2330	0,4	25		2,86E+02
12,1	0,3	6,7	-166	1360	0,1	12		5,68E+01
11,5	0,7	6,8	-130	1010	0,2	7,5		<10

specifieke genen			EPA score	EPA gem	Methaan µg/l	Etheen µg/l	Ethaan µg/l
vcrA copies/ml	bvcA copies/ml	tceA copies/ml					
8,07E+01	<100	<100	10	1,0	403	<<	<<
<100	<100	2,13E+03	10	1,0	155	<<	<<
7,57E+01	<100	<100	16	1,6	669	326	<<
2,86E+03	1,04E+03	<100	14	1,4	504	<<	<<
1,67E+05	4,88E+02	7,86E+03	20	2,0	11717	345	<<
7,91E+03	2,81E+03	<100	17	1,7	3233	81	17
1,74E+02	<100	3,96E+03	10	1,0	413	<<	<<
<100	<100	<100	15	1,5	2710	474	27
2,22E+03	<100	<100	13	1,4	1796	798	56
8,86E+02	<100	<100	16	1,6	4777	485	271
<100	<100	<100	7	0,7	154	<<	<<
<100	<100	<100	15	1,5	9444	<<	11
<100	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	7,60E+01	<100					
<100	5,97E+02	<100					
<100	<100	2,29E+04					
<100	<100	<100					
<100	2,32E+02	2,58E+03			2900	5,3	6,1
<100	1,00E+03	<100			900	211	0,2
<100	<100	<100	20	2,0	1300	7	6,5
8,59E+03	<100	2,62E+04	11	1,8	9300	2800	360
2,22E+05	<100	<100	8	1,6	10000	180	8300
1,51E+05	2,98E+02	<100	10	2,0	7700	11000	490
4,30E+03	6,52E+03	<100	13	1,6	1400	6300	430
1,14E+04	2,01E+02	3,11E+03	13	1,9	3000	34000	74
4,76E+03	<100	<100	12	1,3	12000	7600	760
9,57E+03	<100	<100	16	2,0	28000	39	630
8,44E+02	<100	<100	9	1,5	34000	6	3,4
5,25E+04	2,04E+02	2,59E+03	7	1,2	22000	4200	210
5,42E+02	7,20E+02	<100	10	1,7	21000	76	10
1,23E+04	<100	<100	13	1,3	11000	1100	430
<100	<100	<100	3	0,3	<<	<<	<<
<100	3,59E+02	<100	12	1,2	2184	<<	<<
<100	<100	<100	6	0,7	109	<<	<<
<100	<100	<100	8	0,8	121	<<	<<
<100	<100	2,63E+03	9	0,9	116	<<	<<
<100	<100	<100	9	0,9	135	<<	<<
<100	<100	<100	9	0,9	129	<<	<<
<100	<100	2,05E+03	3	0,3	<<	<<	<<
<100	<100	2,45E+03	5	0,5	98	<<	<<
<100	<100	2,42E+03	?		<<	<<	<<
<100	<100	2,28E+04	5	0,6	216	<<	<<
<100	<100	2,32E+04	5	0,6	77	<<	<<
<100	<100	4,67E+03	2	0,3	200	<,25	1,3
<100	<100	4,93E+03	0	0,0	<25	<,25	<,25
<100	<100	<100	5	0,6	130	<,25	<,25
<100	<100	5,58E+03	8	1,0	700	66	6,6
<100	<100	5,10E+02	8	1,0	280	<,25	2,6
<100	<100	5,25E+03	2	0,3	85	<,25	<,25
1,08E+02	<100	7,38E+03	15	1,9	1600	<,25	90

6,14E+02	<100	5,50E+03	5	0,6	69	0,75	<0,25
1,68E+03	<100	5,70E+03	4	0,5	100	0,3	0,57
<100	<100	4,63E+03	2	0,3	180	<0,25	5,1
<100	<100	<100	8	0,9	<25	<0,25	0,31
<100	2,06E+02	<100	10	1,1	4300	200	320
<100	<100	<100	5	0,6	86	<0,25	<0,25
<100	<100	<100					
1,22E+03	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	<100	<100					
<100	<100	<100	13	1,4	1200	0,46	18
2,41E+01	<15	1,71E+03					
<20	<15	<150					
<20	<15	1,67E+03					
<20	<15	1,79E+03					

<20	<15	<150
<20	<15	<150

3,16E+03	9,98E+02	<150					
2,63E+01	<15	<150					
4,72E+03	<100	9,64E+02	17	1,7	28001	77	646
1,34E+03	3,22E+02	1,50E+03	17	1,7	26461	64	25
2,09E+03	4,63E+02	9,33E+02	20	1,8	16236	184	52
1,02E+04	2,53E+03	9,60E+02	14	1,3	16973	69	16
<100	3,56E+02	8,13E+02	17	1,5	22013	<<	<<
4,49E+02	1,74E+02	9,89E+01	14	1,3	18527	<<	54
6,15E+02	<100	1,23E+02	15	1,4	21164	<<	36
4,70E+02	<100	1,04E+02	17	1,5	28795	<<	<<
5,50E+02	<100	1,06E+02	15	1,4	32861	<<	50
5,74E+02	<100	2,39E+02	17	1,5	24741	<<	<<
1,35E+04	2,46E+02	1,43E+05	13	1,2	11714	12	33
4,89E+02	<100	1,28E+02	17	1,5	23997	<<	141
5,45E+02	<100	1,26E+02	17	1,5	34655	<<	<<
5,39E+02	<100	1,27E+02	17	1,5	17583	<<	116
1,79E+03	1,51E+02	4,47E+03	17	1,5	18800	<<	<<
<100	<100	<100	14	1,3	44061	570	<<
<100	<100	<100	15	1,4	41403	870	574
<100	<100	<100	13	1,2	16400	11151	3326
<100	<100	<100	14	1,3	20440	58	172
<100	<100	<100	12	1,1	24774	12070	1048
<100	<100	<100	12	1,1	18712	412	<<
<100	<100	<100	14	1,3	35475	845	375
7,78E+01	<100	<100	12	1,1	12270	51	239
9,20E+02	<100	<100	14	1,3	48990	<<	21
<100	9,70E+01	<100	14	1,3	8271	<<	47
<100	<100	<100	12	1,1	17015	55	426
<100	<100	<100	10	0,9	3072	<<	<<

VC µg/l	VC-verloop (trend)	CA µg/l	CKW's			1,1-DCA µg/l	1,2-DCA µg/l	1,1,1-TCA µg/l
			1,1-DCE µg/l	trans-DCE µg/l	cis-DCE µg/l			
93	↓	<<	<<	15	1480	<<	17	<<
24	↑	<<	<<	<<	35	<<	<<	<<
1056	↑	<<	23	58	16533	51	26	<<
9,2		<<	<<	<<	276	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
4978		<<	26	33	18360	17	51	<<
726		<<	<<	<<	326	<<	<<	<<
2982	↑	<<	7	10	14034	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	12	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
78	↑		<<	<<	55		<<	<<
28	↓				1,3		<<	<<
0,43	→				2,6		<<	<<
0	→				0,23		<<	<<
5,4	↑				9,1		<<	<<
3,1	↑				13		<<	<<
0,3	→				<0,1		<<	<<
150	↑				4700		2	<<
40	↓				12000		<<	<<
9,7	→	<<	<<	<<	3,2	<<	<<	<<
2,1	↓		<<	<<	3,1			
9100	↓		24	5,3	7600			
14000	↓		88	27	17000			
6600	↑		71	160	11000			
14000	↓		51	39	570			
290	↓		<<	<<	2,3			
500	↑		<<	19	380			
4,6	↓		<<	<<	41			
13000	→		55	14	22000			
510	→		9,1	7,6	2600			
33	↓		<<	<<	<<			
<<		<<	<<	<<	<<	25	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
8,1		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
18,8		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
15,7		<<	<<	<<	68	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	100	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	40	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	311	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	21	<<	<<	137
<<		<<	74	4,6	500	50	<<	171
<<		<<	<<	<<	415	<<	<<	<<
<0,10					13			
1,1					86		0,33	
					46			
5,4					340		1,5	
<0,1					800		0,14	
					0,5		0,12	
					0,37			

3,5		67	1,1
		210	0,24
		1,3	
1,8		600	
870		14000	
		200	
7,9			
0,8			
93			
9,6			
31		270	

18	↓	147	<<	<<	12	<<	<<	<<
133	↑	10	24	10	9908	716	<<	8445
434	→	10	23	13	4861	29	<<	<<
91	→	3	<<	<<	1310	43	<<	<<
	→	<<	<<	<<	<<	98	23	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<	→	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	31	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	13	<<	<<	<<
422	→	<<	<<	44	5574	<<	<<	<<
15		<<	<<	<<	58	<<	<<	<<
<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<	→	<<	<<	<<	5	<<	<<	<<
<<	→	<<	<<	<<	10	<<	<<	<<
139	↓	<<	128	32	23	73	23654	<<
<<	→	<<	<<	<<	5	20	2919	<<
<<	↓	308	<<	<<	<<	<<	217	<<
<<	→	184	<<	<<	<<	<<	19	<<
377	↓	<<	<<	6	13	87	26095	<<
46		<<	<<	<<	<<	<<	2177	<<
<<	→	<<	<<	<<	7	<<	16	<<
<<	↓	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<	↓	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<	→	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<	↓	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
<<	→	148	<<	<<	<<	<<	<<	<<

TRI µg/l	PER µg/l	CKW-tot Concentra- tieverloop (trend)	Chloride (mg/l)	Nitriet (mg/l)	Nitraat (mg/l)	Fosfaat opp	Sulfaat (mg/l)
230	6	↓	437	<<	<<	<<	97,9
214	63	→	138	<<	<<	<<	55,8
19779	34954	↑	582	<<	0,04	<<	80,6
236	591		723	<<	<<	<<	65,4
<<	<<		1653	<<	0,07	<<	0,1
<<	<<		1487	<<	<<	<<	0,1
<<	<<		434	<<	<<	<<	112,3
2014	978		623	<<	0,4	<<	32,4
<<	<<		211	<<	0,7	<<	10,3
<<	<<	↑	213	<<	0,0	3,4	16,0
36	60	↑	65	<<	0,0	9,1	7,8
<<	<<		232	<<	0,6	<<	1,6
<<	<<	→					
<<	<<	↓					20
<<	<<	→					
<<	<<	→					
28	<<	→			<0,2		
2,2	<<	↑			<0,2		
<<	<<	→					
27	<<	↑			<0,2		27
1,3	<<	↓			<0,2		25
<<	<<	→			<0,0001		220
<<	<<	↓					
<<	<<	↓					
2,9	<<	↓					
190	130	↑			<0,0001		150
460	1400	↓					
<<	6,7	↓			<0,0001		660
18	<<	↑					
<<	<<	↓					
<<	<<	→					
370	940	→					
<<	<<	↓			<0,0001		150
<<	96		460	<<	12	<<	24
<<	34		8	<<	<<	<<	3
12	50		121	<<	<<	<<	102
<<	31		236	<<	<<	<<	257
<<	33		195	<<	<<	<<	210
148	10624		211	<<	<<	<<	115
41	54		159	<<	<<	<<	139
48	5213		115	<<	3	<<	106
221	6077		220	<<	1	<<	101
37	24913		21	0,91	127	1012	33
129	106		47	<<	<<	<<	124
18	22		70	<<	<<	<<	98
560	83		79	<0,1	<0,2		160
4300	420		100	<0,1	1,1		91
<<	<<		35	<0,1	0,24		180
470	66		210	<0,1	2		150
8,2	<<		84	<0,1	<0,2		89
<<	<<		100	<0,1	0,22		130
0,21	0,91		520	<0,5	0,29		410

0,2	<<	88	<0,1	0,22	190
170	8,3	490	<0,5	<0,2	72
5,3	1,1	69	<0,1	0,26	170
52	48			0,2	33
13000	38000			<0,2	21
28	0,1			1,2	19

2,7	1,3			0,23	19
-----	-----	--	--	------	----

<<	<<	↓		<<	<<	<<
632	87154	↑		<<	<<	<<
2578	152			<<	<<	0,36
2058	10613	↑		<<	<<	<<
208	1971	↑		526	<<	<<
<<	<<			<<	<<	<<
<<	<<	→		<<	<<	<<
<<	<<			<<	<<	<<
<<	48			<<	2	<<
<<	<<			<<	<<	<<
<<	<<	→		<<	<<	<<
36	105			<<	<<	<<
<<	<<			<<	<<	<<
<<	<<	→		<<	<<	<<
<<	<<	→		<<	<<	<<
154	1083	↓	2288	<<	<<	3778
<<	13	→	2100	<<	<<	186
10	<<	↓	9740	<<	<<	14033
<<	13	→	1740	<<	<<	8894
12	<<	↓	2333	<<	<<	2385
6	<<		1740	<<	<<	<<
<<	24	→	2088	<<	<<	776
<<	<<	↓	153	<<	0,45	453
<<	<<	↓	4030	<<	0,63	761
<<	<<	→	920	<<	<<	501
<<	<<	↓	280	<<	0,58	2499
<<	<<	→	155	<<	<<	<<