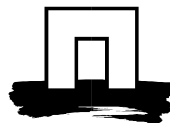


TRIADE: veldinventarisaties van micro-organismen en microcosmosproeven

Jaap Bloem, Lucas Bouwman, Popko
Bolhuis, Meint Veninga en An Vos

(ECB, voorheen AB-DLO)



ALTERRA

RESEARCH INSTITUUT VOOR DE GROENE RUIMTE

Wageningen, 2000

Alterra is de fusie tussen het Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek (IBN) en het Staring Centrum, Instituut voor Onderzoek van het Landelijk Gebied (SC) en een deel van AB-DLO. De fusie is ingegaan op 1 januari 2000.

Veldinventarisaties van micro-organismen op Schietbaan Bornia, SBNS Kerkrade en NAM Schoonebeek

Inleiding

Rol en functie van micro-organismen in bodemecosystemen

Micro-organismen zijn de primaire afbrekers van dode organische stof, zoals plantenresten, dode wortels, door wortels uitgescheiden stoffen, dode micro-organismen en dierlijke mest. Ze vormen het voedsel van microbivoren, zoals protozoën en nematoden, en spelen een sleutelrol in voedselwebben en nutriëntenkringlopen (Bouwman *et al.*, 1994; Bloem *et al.*, 1997). Per hectare zit in de bouwvoor van een Nederlandse landbouwgrond ongeveer 3000 kg biomassa (versgewicht). Dit is gelijk aan de massa van 4 koeien, 60 schapen of 35 boeren. De biomassa in de bodem bestaat grotendeels uit micro-organismen. In 1 gram grond zitten circa een miljard bacteriën en tientallen meters schimmeldraden. Die breken circa 5000 kg organische stof per hectare per jaar af in een akkerbodem. Hierbij komt circa 100 kg stikstof $\text{ha}^{-1}\text{jaar}^{-1}$ vrij in minerale vorm. Dit is ongeveer de helft van de stikstofbehoefte van een landbouwgewas. Bij de mineralisatie door heterotrofe micro-organismen komt in eerste instantie ammonium vrij. Ammonium wordt door een gespecialiseerde groep bacteriën, de nitrificerders, omgezet in nitraat. Nitraat kan veel gemakkelijker door het gewas worden opgenomen dan ammonium. Bacteriën spelen ook een rol bij de vorming en instandhouding van bodemstructuur, doordat ze stoffen maken (polysacchariden, humusverbindingen en colloïden) die bodemaggregaten bijeenhouden. Bacteriën zijn direct betrokken bij de uitvoering van alle door Schouten *et al.* (1997) gedefinieerde Life Support Functies: (1) de afbraak van organisch materiaal, (2) de recycling van voedingsstoffen, (3) bodemstructuurvorming, en (4) de stabiliteit van het bodemecosysteem. Nitrificerders zijn essentieel voor (5) de beschikbaarheid van voedingsstoffen voor planten. Protozoën (amoeben en flagellaten) en nematoden zijn de belangrijkste microbivoren. Ze spelen een belangrijke rol bij de mineralisatie van organische stof, en ze kunnen door hun graasactiviteit de microbiële activiteit stimuleren, bijvoorbeeld door het recyclen van nutriënten die de bacteriegroei beperken. De bacteriële biomassa en activiteit maken deel uit van de biologische indicatoren die worden bepaald in het kader van het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit (LMB) van het RIVM (Schouten *et al.*, 1999).

Microbiologische indicatoren voor bodemkwaliteit

Op dit moment worden er in gevallen van bodemverontreiniging en sanering nog nauwelijks microbiologische parameters gemeten. Als dit al gebeurt wordt meestal de bodemademhaling (zuurstofverbruik of CO_2 -productie) gemeten. Metingen van de bodemademhaling vereisen relatief lange incubaties. In gronden waarin geen grote hoeveelheden gemakkelijk afbreekbare organische verbindingen zitten, is het zuurstofverbruik zo laag dat de monsters 2 tot 6 weken geïncubeerd moeten worden om de respiratie te kunnen meten. Het meten van de bodemademhaling alleen geeft vaak onvoldoende inzicht in het functioneren van de bodemmicro-organismen. Omdat iedere methode zijn beperkingen heeft zijn meestal meerdere parameters nodig om betrouwbare conclusies te kunnen trekken (Brookes, 1995).

Bij bodemecologisch onderzoek van landbouwgronden en natuurterreinen worden meerdere biologische parameters tegelijk gemeten om een zo volledig mogelijk inzicht te krijgen in effecten van bodemverontreiniging en beheersmethoden op bodemecosystemen. AB-DLO verricht, naast traditionele metingen van de bodemademhaling, metingen van o.a. de microbiële biomassa, groeisnelheid, en genetische diversiteit (DNA-polymorfie). De gebruikte methoden (automatische beeldverwerking, inbouw van gelabelde verbindingen door microben, analyse van DNA-bandenpatronen met denaturatie gradiënt gel electroforese) komen oorspronkelijk uit de aquatische ecologie (Bjørnsen, 1986; Moriarty, 1986; Muijzer *et al.*, 1993), en worden sinds ongeveer 1990 toegepast in de bodemecologie met goede resultaten (Bååth, 1990; Bloem *et al.*, 1995a). Uit recent onderzoek van AB-DLO blijkt dat in landbouwgronden die licht met koper zijn verontreinigd (70-200 mg Cu kg^{-1}) de bacteriële groeisnelheid, gemeten als thymidine en leucine inbouw, na 13 jaar nog steeds met 75% is gereduceerd terwijl de biomassa en de ademhaling niet significant lager zijn dan in schone grond. Bij toevoeging van koper aan schone grond werd de groeisnelheid al geremd bij 10 mg Cu kg^{-1} , terwijl de biomassa en de ademhaling pas bij 100 mg Cu kg^{-1} afnamen. De bodemademhaling is relatief ongevoelig voor verontreiniging met zware metalen (Brookes, 1995). Bååth (1992) en Díaz-Raviña en Bååth (1996) vonden ook significante effecten van zware metalen op de bacteriële thymidine- en leucine-inbouw. Bij ernstiger verontreinigingen met nikkel, chroom en zink werden ook

grote reducties (met 66-95%) in de bacteriële biomassa aangetoond. Ook de genetische diversiteit was gereduceerd. In verontreinigde gronden werden minder bacteriële DNA-banden (30-40) gevonden dan in schone controle gronden (50).

Deze technieken, waarbij bacteriële parameters op directe wijze worden gemeten, lijken dus veelbelovend voor het meten van effecten van bodemverontreiniging en bodembeheer op micro-organismen in de bodem. Er kan ook interessante informatie worden verkregen met (indirecte) selectieve tellingen van uit de bodem geïsoleerde bacteriën die kunnen groeien op bepaalde voedingsmedia (Doelman *et al.*, 1994). Op deze wijze kan de gevoeligheid voor en resistentie tegen verontreiniging met zware metalen worden bepaald. Een nadeel van dergelijke technieken is dat slechts een klein deel (<10%) van de totale bacteriepopulatie in de bodem kan worden geïsoleerd en gekweekt. Daarom is hier gekozen voor methoden waarbij zoveel mogelijk de totale *in situ* aanwezige populatie wordt gemeten. De bacteriële biomassa en activiteit hangen direct samen met het functioneren van het bodemecosysteem.

Materiaal en methoden

Monsternamen en bewerking monsters

Van elke locatie werd een mengmonster samengesteld. De grond werd in plastic emmers vervoerd naar het lab en daar tot de verwerking bewaard bij 12 °C.

Specifieke metingen

Het totale aantal bacteriën en de afmetingen van de cellen werd bepaald door middel van directe microscopische tellingen (Bloem *et al.*, 1995b,c). Dit gebeurt in grondpreparaten waarin de micro-organismen zijn gekleurd met een fluorescerende verbinding. Uit het aantal en de afmetingen worden het biovolume en de biomassa berekend. Deze metingen zijn subjectief, onnauwkeurig en tijdrovend als ze met het oog worden verricht. Daarom heeft AB-DLO apparatuur en een computerprogramma ontwikkeld waarmee deze metingen volledig automatisch worden uitgevoerd met behulp van een confocale laser-scan microscoop en automatische beeldverwerking (Bloem *et al.*, 1995a).

De groeisnelheid van bacteriën werd bepaald door de inbouw van radioactief gelabelde ³H-thymidine en ¹⁴C-leucine in respectievelijk DNA en eiwitten te meten (Michel en Bloem, 1993). Omdat de thymidine met ³H en de leucine met ¹⁴C is gelabeld kunnen beide parameters (de microbiële DNA- en eiwitsynthese) in één bepaling worden gemeten. Het verband van de groeisnelheid met thymidine-inbouw is constanter dan met leucine-inbouw. Daar staat tegenover dat sommige soorten bacteriën, vooral anaërobe, thymidine niet kunnen inbouwen, terwijl leucine door vrijwel alle bacteriën kan worden ingebouwd. Daarom worden beide methoden gelijktijdig gebruikt. De incubaties zijn zo kort (circa 1 uur) dat de groeisnelheid van de bacteriën niet verandert tijdens de incubatie. Dit gebeurt pas nadat de lopende DNA-replicatieronde is voltooid. In principe wordt dus de *in situ* groeisnelheid gemeten. Ook de biomassameting wordt niet beïnvloed door monsternamen en incubatie omdat het monster direct na de monsternamen wordt gefixeerd en geconserveerd met formaldehyde. Zowel de biomassa- als de groeisnelheidsmeting zijn ook toepasbaar in anaërobe monsters (Moriarty, 1986).

De potentiële nitrificatie werd bepaald volgens Alef, 1995. Hierbij werd ammoniumsulfaat (1 mg g⁻¹ grond) toegevoegd en werd de grond 3 weken geïncubeerd bij 25 °C en een vochtgehalte van 50% van de waterhoudende capaciteit. Daarna werd de hoeveelheid ammonium en nitraat gemeten. Hiervan werden de gehalten van blanco's afgetrokken. De blanco's werden geïncubeerd bij -20 °C.

Protozoën (amoeben en flagellaten) werden geteld door middel van de most probable number (MPN) methode volgens Darbyshire *et al.* (1974). Hierbij werden viervoudige verdunningseries gemaakt in microtiterplaten met P&J medium (Prescott and James, 1955) en *Pseudomonas fluorescens* als voedsel-bacterie. Na 2 en 4 weken incubatie bij 18 °C werden de platen gecontroleerd op de aanwezigheid van amoeben en flagellaten.

Gegevensbewerking

Er werden drie categorieën bodemmonsters geanalyseerd: schoon, matig en zwaar verontreinigd. Het betrof de volgende locaties en monsterpunten:

Schietbaan (Bornia): 28, 3 en 119+120 met loodconcentraties van respectievelijk 11, 290 en 880 mg Pb kg⁻¹.

SBNS terrein Kerkrade: T9v2, T8v6 en T7v4 met respectievelijk 75, 490 en 1300 mg Zn kg⁻¹ en 2.2 13 en 73 mg PAK kg⁻¹. Daarnaast was de grond verontreinigd met andere zware metalen en olie.

NAM terrein Schoonebeek: 039, 010 en 013 met respectievelijk <25, 3600 en 13900 mg olie kg⁻¹.

Voor de bepalingen werden uit de mengmonsters van iedere categorie 3 replicaties gebruikt. De bacterietellingen werden bij de eerste monsternamen van de schietbaan ook in 3-voud uitgevoerd. Vanwege de lage aantallen (en daardoor relatief grote spreiding) werd het aantal replicaties verhoogd tot 9 bij de monsters van de volgende locaties. Omdat er te weinig grond was van Kerkrade (bevatte stenen en ijzerafval) en Schoonebeek (veen met veel volume maar weinig gewicht) werd bij deze monsters de potentiële nitrificatie niet in 3-voud maar in 2-voud bepaald.

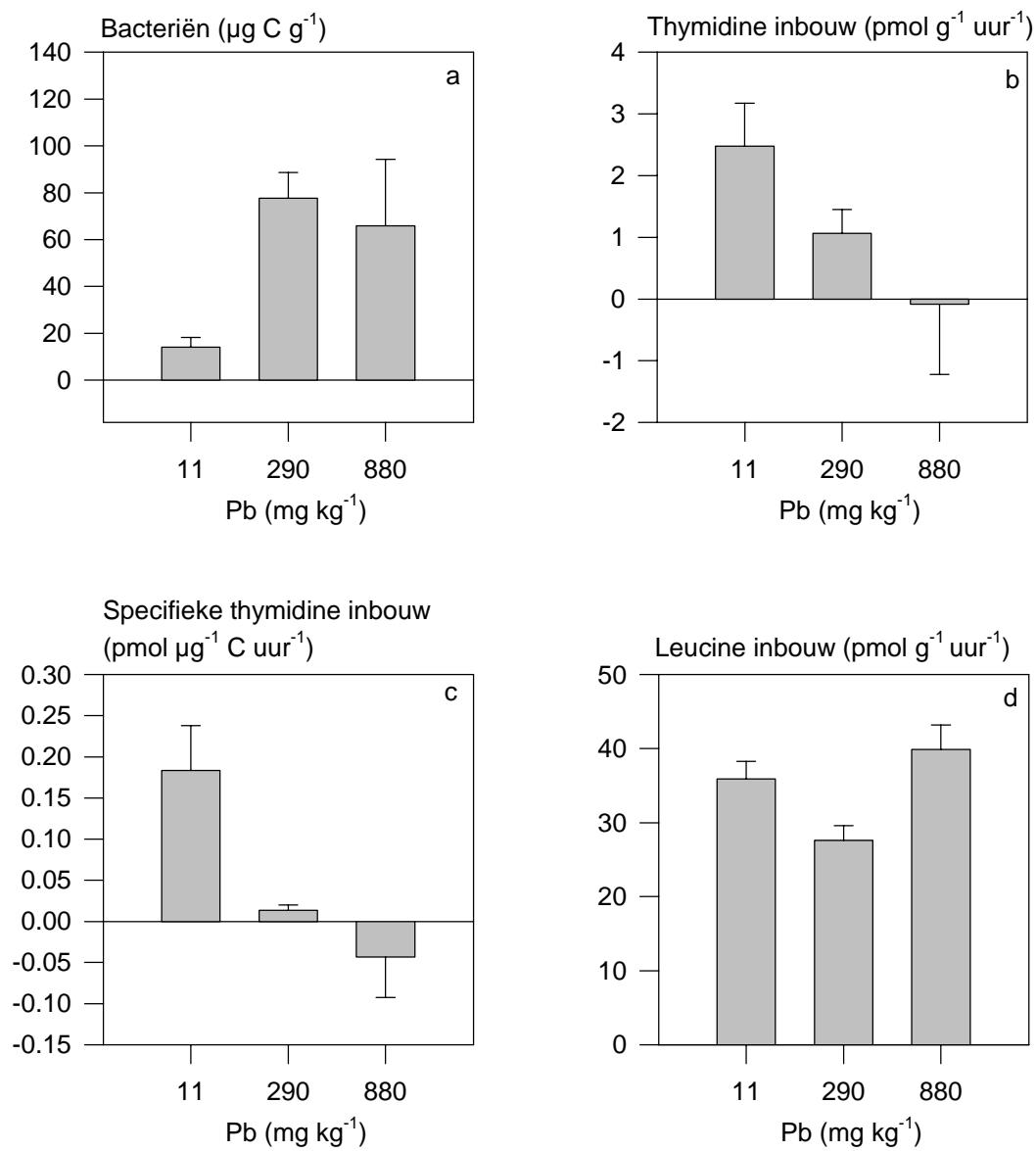
De statistische significantie van verschillen tussen de categorieën monsters (schoon, matig, vuil) werd getoetst door middel van variantieanalyse (F-toets gevolgd door Student-t-toets). Indien nodig werden de gegevens log-getransformeerd voor de analyses.

Resultaten Schietbaan

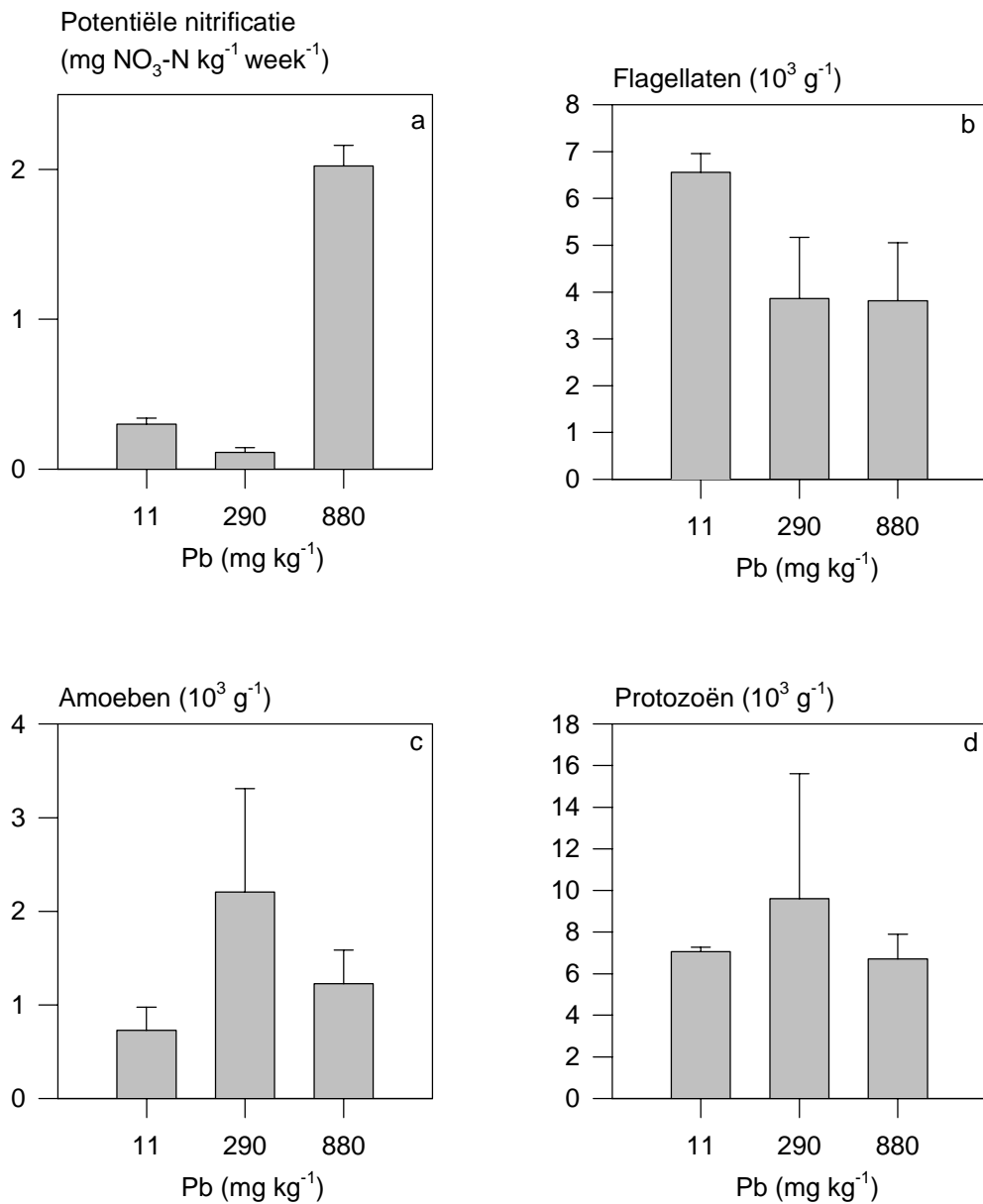
De biomassa en activiteit van de micro-organismen in de bodem van de schietbaan waren erg laag. De waarden die in de schone grond (11 mg Pb kg⁻¹) werden gemeten zijn wel eens eerder in een bodem op de Veluwe gevonden, maar ze liggen dicht bij waarden die meestal in de diepere minerale ondergrond (C laag) worden gevonden. In de schone grond was de bacteriële biomassa 14 µg C g⁻¹ grond (Fig. 1a). In vergelijkbare zandgronden (0-10 cm diepte) met grasvegetatie op de Veluwe en Schiermonnikoog werden bacteriële biomassa's gevonden van 20 – 180 µg C g⁻¹. Onder gras op klei zijn waarden van 500 µg C g⁻¹ gemeten. De thymidine inbouw (DNA synthese) in de schone grond van de schietbaan bedroeg 2.5 picomol thymidine g⁻¹ grond uur⁻¹ (Fig. 1b), terwijl op de Veluwe en Schiermonnikoog in gras op zand waarden van 0 tot 12 pmol g⁻¹ uur⁻¹ werden gemeten. In grasland op klei werd circa 200 pmol g⁻¹ uur⁻¹ gemeten (Schouten *et al.*, 1999). De potentiële nitrificatie bedroeg minder dan 2 mg NO₃-N kg⁻¹ week⁻¹ (Fig. 2a), terwijl in andere gronden waarden van 70 – 100 mg NO₃-N kg⁻¹ week⁻¹ werden gevonden (Schouten *et al.*, 1999). Het totale aantal protozoën was minder dan 10.000 g⁻¹ grond (Fig. 2d) terwijl in vergelijkbare zandgronden aantallen van 15.000 - 60.000 protozoën g⁻¹ werden gevonden. Door de zeer lage microbiële biomassa en activiteit was de spreiding relatief groot, en waren statistisch significante verschillen moeilijker aan te tonen.

De bacteriële biomassa was in de verontreinigde grond aanzienlijk hoger dan in de schone grond (P = 0.09) (Fig. 1a) terwijl de groeisnelheid (thymidine inbouw in DNA) daarentegen afnam met de loodconcentratie (P = 0.16) (Fig. 1b). Deze verschillen waren niet significant. Om significante verschillen aan te tonen is bij deze lage meetwaarden een groter aantal replicaties nodig. De hogere biomassa en de lagere groeisnelheid in de verontreinigde grond hadden echter tot gevolg dat de specifieke groeisnelheid (groei per cel of per eenheid biomassa) praktisch nul was (Fig. 1c). Voor deze parameter was het verschil tussen de schone en de verontreinigde grond wel significant (P= 0.02). In eerdere proeven is waargenomen dat bij verontreiniging met zware metalen de bacteriële groeisnelheid (thymidine inbouw) het eerst wordt geremd terwijl de biomassa aanvankelijk gelijk blijft of zelfs toeneemt. Dit laatste kan gebeuren als bacterievoren worden gereduceerd waardoor de graasdruk op de bacteriën afneemt. Hierdoor blijven er meer bacteriën over, zelfs bij een verlaagde groeisnelheid. Bij hogere metaalconcentraties (> 1000 mg kg⁻¹) wordt naast de groei ook de biomassa sterk gereduceerd (Van den Munckhof *et al.*, 1998).

In tegenstelling tot de thymidine inbouw (DNA synthese of vorming van nieuwe cellen) was de leucine inbouw (eiwitsynthese) van de bacteriën niet gereduceerd. De eiwitsynthese bestaat bij dergelijke lage groeisnelheden voornamelijk uit turnover (vervanging en onderhoud) van celmateriaal. Deze turnover was blijkbaar niet geremd door de verontreiniging. Bij hogere groeisnelheden wordt een groter deel van de gevormde eiwitten gebruikt voor de vorming van nieuwe cellen, en vertonen de DNA synthese en de eiwitsynthese meer overeenkomst. In eerdere veldwaarnemingen bij hogere groeisnelheden en bij hogere metaalconcentraties werd de leucine inbouw (eiwitsynthese) wel geremd maar was minder gevoelig dan de thymidine inbouw (DNA synthese) (Van den Munckhof *et al.*, 1998).



Figuur 1. Bacteriële biomassa (a), thymidine inbouw (maat voor DNA-synthese en groeisnelheid) (b), specifieke thymidine inbouw (per eenheid bacterie-biomassa) (c) en leucine inbouw (maat voor eiwitsynthese) (d) bij verschillende loodconcentraties in de grond van de schietbaan (Bornia). De foutenbalken geven de standaard fout (n=3).



Figuur 2. Potentiële nitrificatie (a), flagellaten (b) amoeben (c) en het totale aantal protozoën (d) bij verschillende loodconcentraties in de grond van de schietbaan (Bornia). De foutenbalken geven de standaard fout (n=3).

Dit wijst erop dat de reproductie (groei), die gepaard gaat met DNA synthese en celdeling, gevoeliger is voor stress door zware metalen dan de eiwitsynthese voor het onderhoud van de bacteriecellen (turnover).

De potentiële nitrificatie was niet geremd in de met lood verontreinigde grond (Fig. 2a). De hoogste waarde werd gevonden bij de hoogste loodconcentratie. De aantallen flagellaten, amoeben en het totale aantal protozoën vertoonden geen verband met de loodverontreiniging (Fig. 2b,c,d).

De specifieke groeisnelheid van de bacteriën was de enige parameter die significant was gereduceerd ($P = 0.02$) in de met lood verontreinigde grond (Fig. 1c). De gereduceerde groeisnelheid (thymidine inbouw) en verhoogde biomassa waren niet statistisch significant ($P =$ respectievelijk 0.16 en 0.09). Dit komt waarschijnlijk door de buitengewoon lage biomassa en de daardoor grote spreiding tussen de replicaties. Protozoën vertonen in het algemeen veel grotere schommelingen in aantallen dan bacteriën (Bloem et al., 1997). Daarom zijn relatief veel replicaties nodig om significante effecten op protozoën aan te tonen. Daarom werden de protozoën op de volgende locaties niet meer gemeten, en werd de vrijkomende capaciteit ingezet om het aantal replicaties voor bacterietellingen te verhogen van 3 naar 9. De gevoeligheid van de thymidine inbouwmetingen werd verhoogd door de incubatietijd te verlengen van 1 uur naar 2 uren waardoor meer label in de biomassa werd ingebouwd.

Resultaten SBNS terrein Kerkrade

De schone grond van Kerkrade bestond uit geel zand met weinig organische stof, terwijl de verontreinigde monsters veel donkerder van kleur waren en duidelijk meer organische stof bevatten. In deze zeer voedselarme grond waren de bacteriële biomassa, groeisnelheid en nitrificatie erg laag (Fig. 3). Door het grote verschil in bodemsamenstelling was de schone grond geen bruikbare referentie voor de verontreinigde grond.

Er was geen zichtbaar verschil in bodemtype tussen de matig en zwaar verontreinigde grond. De matig verontreinigde grond had een lage bacteriële biomassa en een behoorlijke bacteriële groeisnelheid (thymidine en leucine inbouw). Bovendien was dit de eerste grond tot nog toe waarin de potentiële nitrificatie ($93 \text{ mg NO}_3\text{-N kg}^{-1} \text{ week}^{-1}$) net zo hoog was als normaal in landbouwgronden wordt gevonden (Schouten et al., 1999). Dit betekent dat bijna alle toegevoegde ammonium werd omgezet in nitraat. In de zwaar verontreinigde grond waren de bacteriële biomassa en de nitrificatie 80% lager dan in de matig verontreinigde grond ($P < 0.001$). De thymidine inbouw (DNA synthese) en de leucine inbouw (eiwitsynthese) waren 60% lager ($P < 0.0001$). Indien wordt aangenomen dat de bodemeigenschappen in de matig en zwaar verontreinigde grond vergelijkbaar waren, dan wijzen de resultaten op sterke negatieve effecten van de verontreiniging.

Resultaten NAM terrein Schoonebeek

De bacteriële biomassa in de met olie verontreinigde grond van Schoonebeek was 6-16 x hoger dan in de schone grond ($P < 0.0001$) (Fig. 4). De bacteriële groeisnelheid (thymidine en leucine inbouw) was in alle monsters laag en vertoonde geen verband met de olieverontreiniging. De potentiële nitrificatie was wel lager in de verontreinigde grond, maar deze was ook in de schone grond bijna nihil. Er zijn dus geen aanwijzingen voor negatieve effecten van de olie op de bodembacteriën.

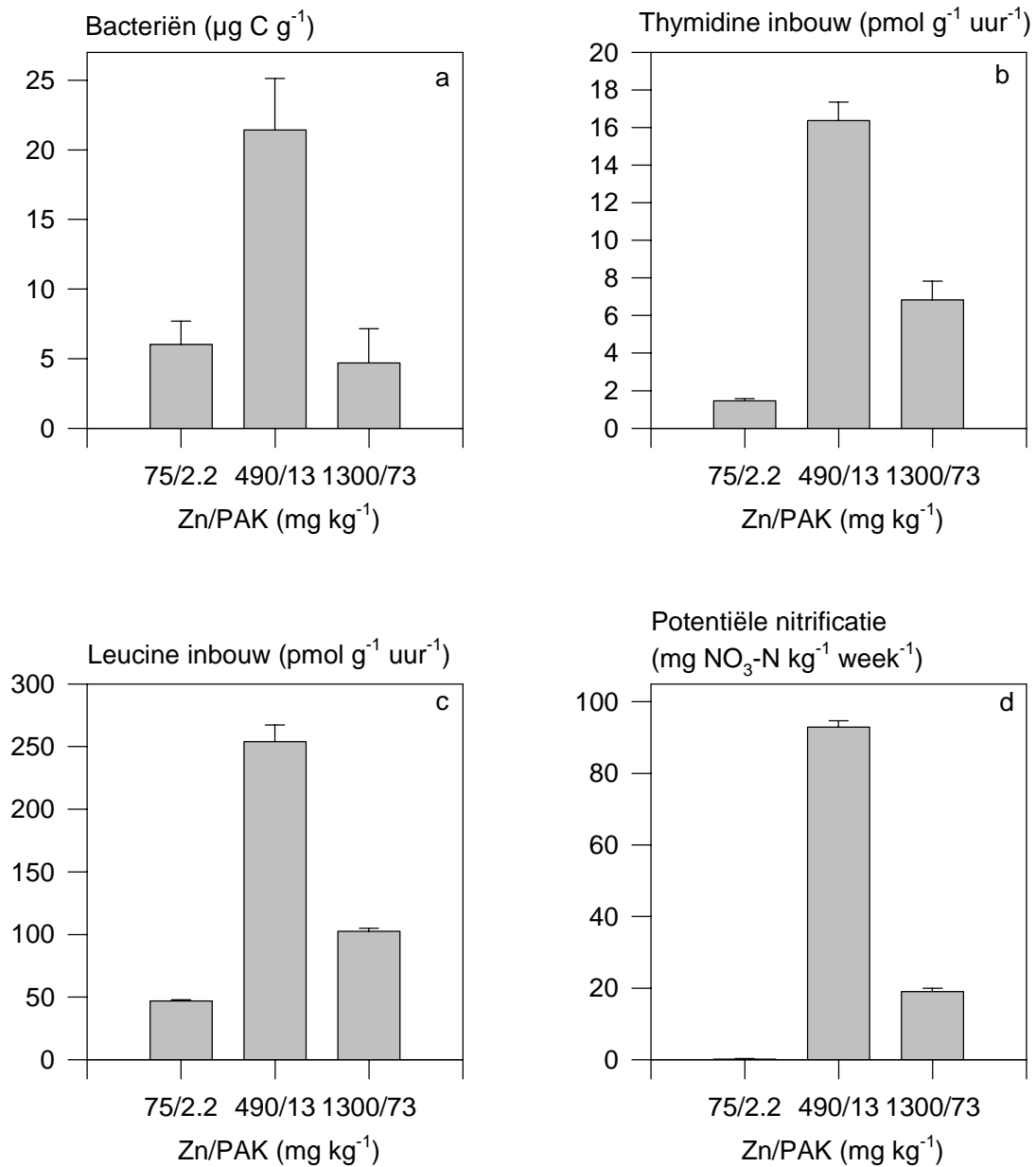


Fig. 3. Bacteriële biomassa (a), thymidine inbouw (maat voor DNA-synthese en groeisnelheid) (b), leucine inbouw (maat voor eiwitsynthese) (c) en potentiële nitrificatie (d) bij toenemende verontreiniging met o.a. zink en PAK in de grond van het SBNS terrein in Kerkrade. De schone grond (75/2.2) bevatte veel minder organische stof dan de verontreinigde grond, en was daarom niet geschikt als referentie. De foutenbalken geven de standaard fout (n=9 voor a; 3 voor b en c; 2 voor d).

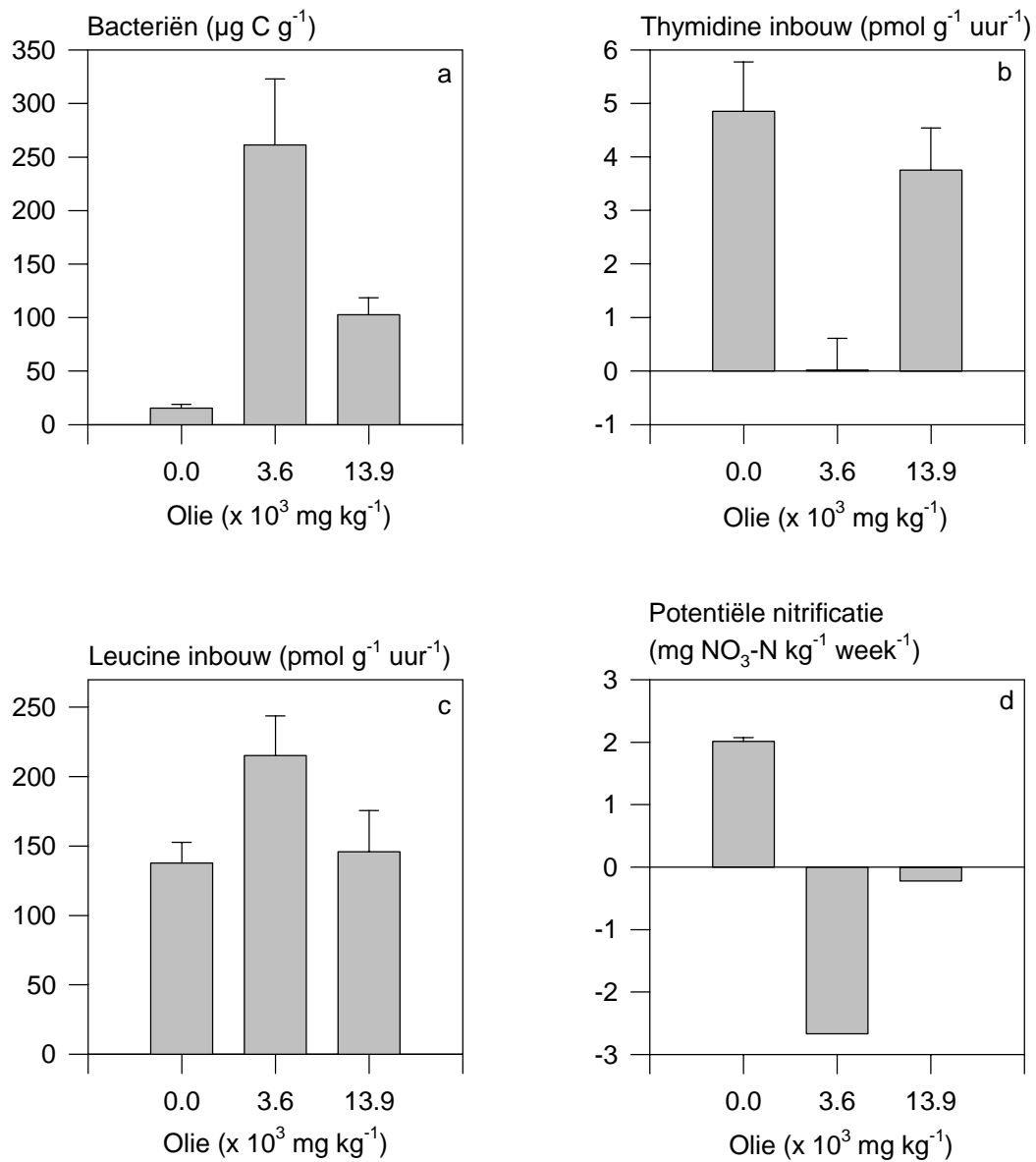


Fig. 4. Bacteriële biomassa (a), thymidine inbouw (maat voor DNA-synthese en groeisnelheid) (b), leucine inbouw (maat voor eiwitsynthese) (c) en potentiële nitrificatie (d) bij toenemende verontreiniging met olie in de grond van het NAM terrein in Schoonebeek. De foutenbalken geven de standaard fout (n=9 voor a; 3 voor b en c; 2 voor d).

Conclusies

In de bodemmonsters van de schietbaan (Bornia) waren de microbiële biomassa en activiteit buitengewoon laag. In de met lood verontreinigde grond werden een hogere bacteriële biomassa en een lagere bacteriële groeisnelheid gevonden. Hierdoor was de specifieke groeisnelheid (per bacteriecel) praktisch nul, en significant lager dan in de schone grond. De potentiële nitrificatie en de aantallen protozoën vertoonden geen verband met de verontreiniging. Dit wijst op een matige stress in de met lood verontreinigde grond. Bij hogere stress zouden ook de bacteriële biomassa en de protozoën zijn gereduceerd.

De schone grond (geel) van het SBNS terrein in Kerkrade week te veel af van de verontreinigde grond (zwart) om als referentie te kunnen dienen. In de zwaar verontreinigde grond waren de microbiële groeisnelheid, biomassa en de potentiële nitrificatie 60-80% lager dan in de matig verontreinigde grond. Dit wijst op sterke negatieve effecten van de verontreiniging op de bodembacteriën.

In de grond van de NAM in Schoonebeek werden geen aanwijzingen gevonden voor negatieve effecten van de olieverontreiniging op de biomassa en activiteit van de bodembacteriën.

Referenties

- Alef, K. 1995. Nitrogen mineralization in soils. In "Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry" (K. Alef and P. Nannipieri, editors), pp. 240-241. Academic Press, London.
- Bååth, E. 1990. Thymidine incorporation into soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* **22**, 803-810.
- Bååth, E. 1992. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization centrifugation. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 1167-1172.
- Bjørnsen, P.K. 1986. Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 1199-1204.
- Bloem, J., M. Veninga and J. Shepherd. 1995a. Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 926-936.
- Bloem, J., P.R. Bolhuis, M.R. Veninga and J. Wieringa. 1995b. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In "Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry" (K. Alef and P. Nannipieri, editors), pp. 162-173. Academic Press, London.
- Bloem, J. 1995c. Fluorescent staining of microbes for total direct counts. In "Molecular Microbial Ecology Manual" (A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn, editors), pp 4.1.8:1-12. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bloem, J., P.C. de Ruiter and L.A. Bouwman. 1997. Food webs and nutrient cycling in agro-ecosystems. In "Modern Soil Microbiology" (J.D. van Elsas, J.T. Trevors and E. Wellington, editors), pp. 245-278. Marcel Dekker Inc. New York.
- Brookes, P.C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils* **19**, 269-279.
- Darbyshire J. F., R. E. Wheatley, M. P. Greaves, and R. H. E. Inkson. 1974. A rapid micromethod for estimating bacterial and protozoan populations in soil. *Rev. Écol. Biol. Sol* **11**, 465-475.
- Díaz-Raviña, M., and E. Bååth. 1996. Thymidine and leucine incorporation into bacteria from soils experimentally contaminated with heavy metals. *Applied Soil Ecology* **3**, 225-234.
- Doelman, P., E. Jansen, M. Michels and M. van Til. 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils* **17**, 177-184.
- Michel, P.H., and J. Bloem. 1993. Conversion factors for estimation of cell production rates of soil bacteria from thymidine and leucine incorporation. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 943-950.
- Moriarty, D.J.W. 1986. Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. *Advances in Microbial Ecology* **9**, 245-292.
- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
- Prescott, D.M., and T.W. James. 1955. Culturing of *Amoeba proteus* on *Tetrahymena*. *Exp. Cell Res.* **8**:256-258.

- Schouten, A.J., L. Brussaard, P.C. de Ruiter, H. Siepel en N.M. van Straalen. 1997. Een indicatorsysteem voor life support functies van de bodem in relatie tot biodiversiteit. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven. Rapportnr. 712910005.
- Schouten, A.J., A.M. Breure, J. Bloem, W. Didden, P.C. de Ruiter, H. Siepel. 1999. Life support functies van de bodem: operationalisering t.b.v. het biodiversiteitsbeleid. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven. Rapportnr. 607601003.
- Van den Munckhof, G.P.M., M.F.X. Veul, C.A.M. van Gestel en J. Bloem. 1998. Bodemkwaliteitsparameters. Stimulering gebruik ecotesten. Rapporten Programma Geïntegreerd Bodemonderzoek deel 14. Wageningen

Microcosmosproeven met verontreinigde grond van grotere diepte: EPON locatie Nijmegen en Gasfabrieksterrein Oude Pekela

Inleiding

Indien de aantallen organismen in de bodem te laag zijn om zinvolle veldinventarisaties uit te kunnen voeren, bijvoorbeeld op locaties waar de bodemverontreiniging op grotere diepte zit, kunnen microcosmosproeven worden uitgevoerd. Hierbij wordt getest of een bodemvoedselweb normaal kan functioneren in de betreffende grond. Daarom wordt de grond gesteriliseerd, verrijkt met voedsel voor de organismen, en opgeënt met een grondmonsters waarin de diverse functionele groepen van het voedselweb aanwezig zijn.

Het bodemvoedselweb speelt een sleutelrol in de stofstromen en nutriëntenkringlopen in de bodem. (Bloem *et al.*, 1994, 1997) Een voedselweb kan worden gedefinieerd als een netwerk van consument-voedselbron interacties (trofische interacties) tussen verschillende functionele groepen van bodemorganismen. Bacteriën en schimmels zijn de voornaamste consumenten van dood organisch materiaal, zoals plantenresten en mest. In veel gronden zijn de bacteriën kwantitatief het belangrijkste (80% van de totale biomassa). Protozoën (eencellige diertjes, zoals amoeben en flagellaten) en nematoden (aaltjes) zijn de voornaamste consumenten van bacteriën en schimmels. Protozoën en nematoden kunnen op hun beurt weer worden gegeten door mijten en springstaarten. Bij iedere trofische interactie wordt organische stof gemineraliseerd tot CO₂, water, stikstof, fosfaat en andere voedingszouten die van belang zijn voor plantengroei. Het niet aangetast zijn van het bodemvoedselweb, en de daaraan gekoppelde nutriëntenkringlopen, is daarom een voorwaarde voor een goed functionerend bodemecosysteem.

Bij in-situ sanering van met dieselolie verontreinigde grond, zoals bij de EPON locatie in Nijmegen, worden de oliebestanddelen grotendeels door micro-organismen afgebroken. Hierbij blijven echter residuen over die niet of nauwelijks verder worden afgebroken. Het is de vraag of deze olieresiduen nog een negatieve invloed hebben op de organismen in de bodem en daardoor het functioneren van het bodemecosysteem belemmeren. Door middel van microcosmosproeven werd onderzocht of olieresiduen in bacteriologisch gereinigde grond al of niet een negatief effect hebben op belangrijke functionele groepen van bodemorganismen en op de afbraak van organisch materiaal. Op dezelfde wijze werden effecten van diepere verontreiniging op het gasfabrieksterrein in Oude Pekela onderzocht.

Materiaal en methoden.

Omdat de te testen grond op de EPON locatie zich bevindt op 4 tot 8 m diepte is er van nature weinig organische stof en een lage biologische activiteit (afgezien van olieafbraak in de verontreinigde zone). Ook bij de gasfabriek zit de verontreiniging op wat grotere diepte. Het voedselweb ter plekke zal vooral bestaan uit bacteriën, protozoën en een geringe hoeveelheid nematoden. Een directe bemonstering van deze grond zal waarschijnlijk slechts in beperkte mate informatie opleveren over de mogelijke effecten van de verontreiniging op het bodemleven. Een betere en meer volledige test wordt verkregen door de te testen gronden te verrijken met organische stof, te steriliseren en vervolgens te enten met belangrijke groepen van organismen die normaliter deel uitmaken van de bodemlevensgemeenschap. Dan kan worden bepaald in hoeverre de verontreinigde grond als een gezond ecosysteem kan functioneren, zowel wat betreft de geschiktheid als habitat voor bodemorganismen als de werking van de ecologische kringlopen.

Er kan worden verondersteld dat groepen van de bodemfauna (protozoën, nematoden, mijten en springstaarten) gevoeliger zijn voor negatieve effecten van olieresiduen dan bacteriën. Deze negatieve effecten kunnen directe effecten op de fauna zijn, maar ze kunnen ook indirect werken via een verminderde groei van bacteriën, die de voedselbron vormen voor de fauna. Daarom is het van belang ook de biomassa en de groeisnelheid van de bacteriën te bepalen.

Er werden microcosmos-experimenten uitgevoerd (Bouwman *et al.*, 1994) met 3 categorieën monsters: schoon, matig en vuil. Bij de EPON locatie betrof dit de boorpunten Pb205, Pb 203 en Pb 207 met respectievelijk <25, 1800 en 6800 mg minerale olie kg⁻¹ grond. Bij de gasfabriek betrof het de monsters OP8, OP4 en OP3 met als voornaamste verontreinigende stoffen respectievelijk 1.40, 5500 en 21000 mg cyanide-totaal kg⁻¹ grond, 1.9, 170 en 4400 mg PAK kg⁻¹ grond en <25, 130 en 2900 mg kg⁻¹

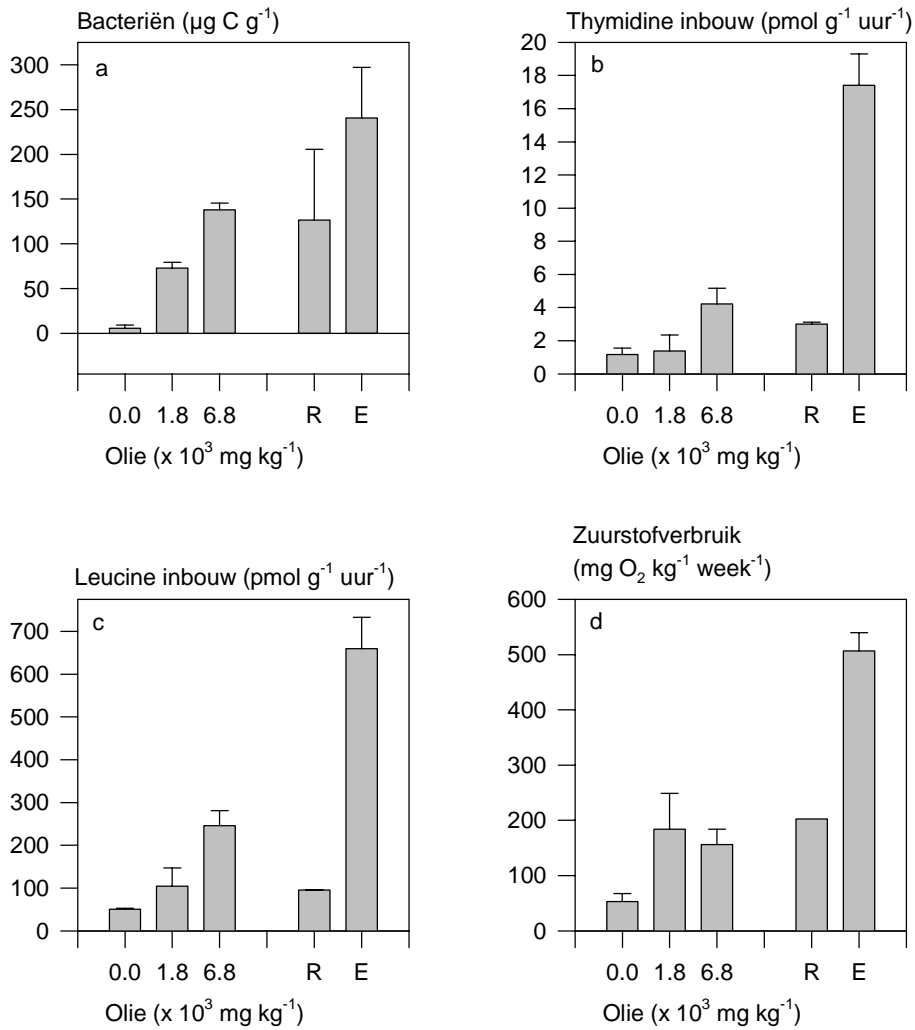
minerale olie. De grondmonsters werden gesteriliseerd door middel van gammastraling (5 Megarad ofwel 56.3 kiloGray) om reeds aanwezige organismen te doden. Hierdoor werd zoveel mogelijk een gelijke uitgangssituatie aangelegd. Per verontreinigingsgraad werden 3 potten gevuld, elk met 250 g grond. De grond werd verrijkt met 2 mg luzernemeel per gram grond. Dit komt overeen met een in de landbouw gangbare hoeveelheid van ca. 3000 kg koolstof in de vorm van gewasresten, per hectare per jaar. De potten werden gevuld met 5 lagen van 50 g steriele grond, waarbij tussen de opeenvolgende lagen telkens 7 gram verse standaard-grond met levende organismen werd aangebracht. Deze openting werd uitgevoerd met verse grond (0-10 cm) van een soortenrijk grasland (Unifarm, Bovenbuurt, Bennekom) waarin alle belangrijke functionele groepen van bodemorganismen voorkomen, zodat alle behandelingen starten met dezelfde organismen in gelijke hoeveelheden. Het vochtgehalte werd op een optimale waarde van 50% van de waterhoudende capaciteit gebracht. Voor elke verontreinigingsgraad werden 3 replicaties gedurende 2 maanden geïncubeerd bij 15 °C. Deze tijd was nodig om ook de langzamer groeiende bodemdieren de kans te geven een normale populatiedichtheid te bereiken. Ter vergelijking werd ook de gesteriliseerde entgrond verrijkt en opgeënt met zichzelf (E). Daarnaast werd bij de EPON proef een pot ingezet met grond van de EPON locatie die in het lab van GeoDelft was gereinigd en waarin nog ongeveer 2000 mg kg⁻¹ olieresidu was achtergebleven (R). Hiervan was onvoldoende grond beschikbaar om replicaties uit te voeren. Bij de later uitgevoerde proef met grond van de gasfabriek werd niet alleen een controle uitgevoerd met de entgrond (E) afkomstig uit de bovengrond (0-10 cm) van de Bovenbuurt, maar ook een controle waarbij gesteriliseerde ondergrond (80-90 cm diepte) werd opgeënt met verse entgrond van 0-10 cm diepte. De grond op de Bovenbuurt is een zandgrond. De bovengrond had een pH-KCl van 5.2 en een organische stof gehalte van 5.65%. De ondergrond had een pH van 6.1 en een organische stof gehalte van 0.75%.

Tijdens de incubaties werd de afbraak van organische stof bepaald via gaschromatografische meting van het zuurstofverbruik en de CO₂-evolutie. Na de incubaties werden de diverse functionele groepen van het voedselweb bepaald. De gebruikte methoden (en referenties) zijn dezelfde als beschreven voor de veldinventarisaties. De bacteriële aantallen en biomassa werden bepaald door middel van confocale laser-scan microscopie en automatische beeldverwerking. De bacteriële groeisnelheid werd gemeten door middel van thymidine- en leucine-inbouw in bacteriële macromoleculen (DNA en eiwitten). Aantallen protozoën werden bepaald via seriële verdunningen en most probable number (MPN) tellingen. Nematoden (bacterivoren, fungivoren en predatoren), mijten (predatoren, nematofagen, cryptostigmaten, bacterivoren en overigen) en springstaarten (predatoren en omnivoren) werden uit de grond geëxtraheerd en microscopisch geteld. Verschillen tussen de schone en de verontreinigde grond werden getoetst door middel van variantieanalyse. De resultaten van de grond met olieresidu (R) werden niet gebruikt voor de statistische analyse omdat er maar 1 pot beschikbaar was.

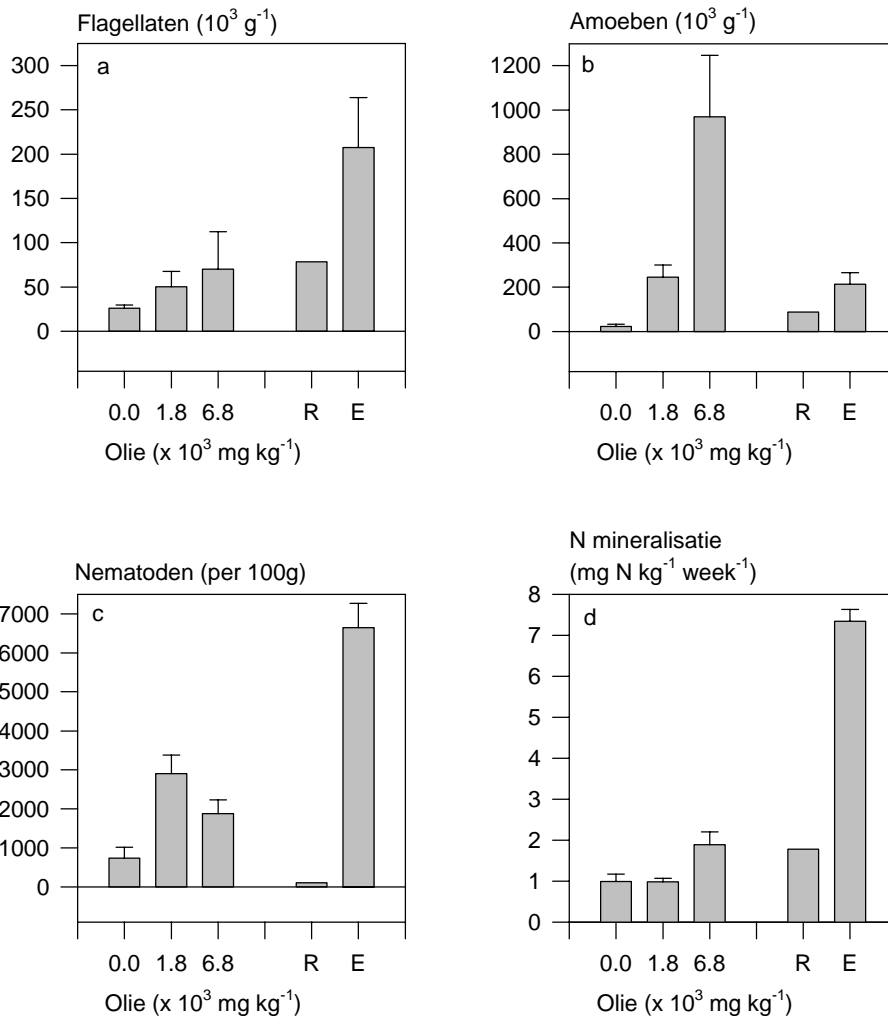
Resultaten EPON locatie

De biomassa en activiteit in de schone EPON-grond waren erg laag (Fig. 1 en 2). Bij het begin van de proef werd een hoeveelheid luzernemeel (2000 mg/kg) toegevoegd die 1000 mg koolstof bevatte per kilogram grond. Uit de bodemademhaling (zuurstofverbruik en CO₂-productie) werd berekend dat in de schone grond maar 160 mg C (16%) van het substraat werd verademd in 8 weken, terwijl normaal in landbouwgrond ongeveer de helft van de C wordt omgezet in CO₂. Een vergelijkbaar lage activiteit in schone grond werd in de volgende proef ook gevonden in de ondergrond (-80 cm) van de Bovenbuurt (Fig. 3 en 4). Een normale afbraak vond wel plaats in de met olie verontreinigde grond (1800, 6800 mg olie kg⁻¹) en in de grond met olieresidu (R). Hierin werd ongeveer 50% van het substraat verademd. Hierbij is geen rekening gehouden met eventuele CO₂ productie ten gevolge van minerale olie afbraak. In de entgrond (Bovenbuurt 0-10 cm) werd veel meer substraat verademd (1500 mg C kg⁻¹) omdat daarin niet alleen toegevoegd substraat maar ook de bij de sterilisatie gedode oorspronkelijke biomassa werd afgebroken.

Alle gemeten organismen en processen waren hoger in de verontreinigde grond dan in de schone grond (Fig. 1 en 2). De verschillen waren statistisch significant voor de bacteriële biomassa ($P < 0.001$), de bacteriële eiwitsynthese (leucine-inbouw, $P = 0.011$), het aantal amoeben ($P < 0.001$), het aantal nematoden ($P = 0.019$) en de stikstof mineralisatie ($P = 0.0369$). De gemineraliseerde N bestond vrijwel volledig uit nitraat. Dit betekent dat de nitrificerende bacteriën goed functioneerden. In de meest verontreinigde grond met 6800 mg olie kg⁻¹ was de netto N mineralisatie hoger dan in de schone grond en net zo hoog als in de grond met slecht afbreekbaar residu.



Figuur 1. Bacteriële biomassa (a), thymidine inbouw (maat voor DNA-synthese en groeisnelheid) (b), leucine inbouw (maat voor eiwitsynthese) (c) en ademhaling (d) in grond met toenemende olieconcentraties en met 2000 mg kg^{-1} olieresiduen (R). De bovengrond van de entgrond (E) werd gebruikt als schone referentie. De foutenbalken geven de standaard fout (n=3).



Figuur 2. Aantallen flagellaten (a) amoeben (b), nematoden (c) en de stikstofmineralisatie (d) in grond met toenemende olieconcentraties en met 2000 mg kg⁻¹ olieresiduen (R). De bovengrond van de entgrond (E) werd gebruikt als schone referentie. De foutenbalken geven de standaard fout (n=3).

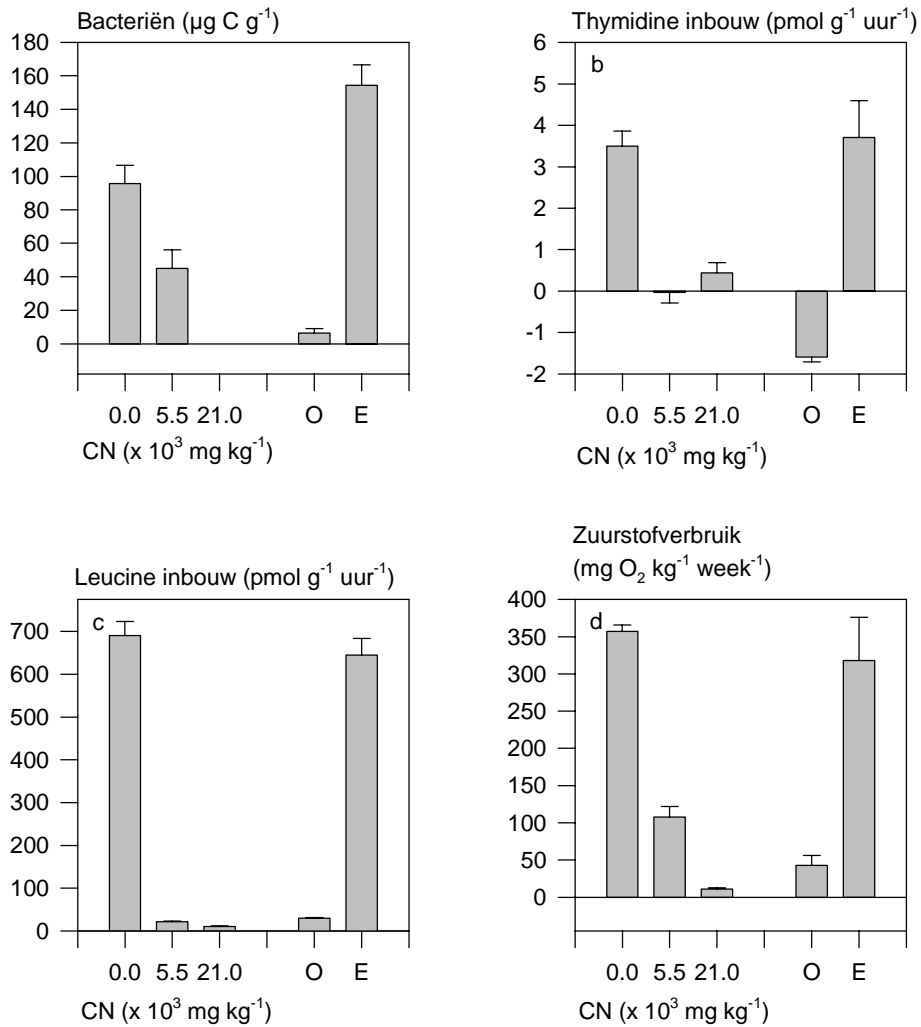
Dit wijst erop dat er tijdens de incubatie weinig olie werd afgebroken. Olie bevat praktisch geen stikstof en afbraak leidt tot netto immobilisatie van N. Het totale aantal nematoden was in de verontreinigde grond significant hoger dan in de schone grond (Fig. 2c). De nematodengemeenschap bestond in alle monsters voornamelijk uit bacterivoren (85%). De hogere aantallen bacterivore nematoden weerspiegelen de hogere bacteriële biomassa (Fig. 1a) en activiteit (Fig. 1 b,c,d) in de verontreinigde grond. De aantallen herbivore en fungivore nematoden waren laag en er waren geen significante verschillen tussen de schone en de verontreinigde grond. De incubatietijd van 2 maanden was te kort om omnivore en predatore nematoden tot ontwikkeling te laten komen. Ook mijten en springstaarten bleken in geen enkele behandeling te groeien, ook niet in de entgrond. De natuurlijke populatie waarmee werd geënt bevatte blijkbaar weinig opportunistische snelle groeiers. Daarom kunnen er geen conclusies worden getrokken over eventuele effecten van olie op mijten en springstaarten. De resultaten geven geen aanwijzingen voor negatieve effecten van de olieverontreiniging op het functioneren van het bodemvoedselweb en de C- en N mineralisatie. De afwezigheid van negatieve effecten in de verontreinigde veldmonsters betekent niet noodzakelijk dat er geen enkel effect is van de verontreiniging. Er is geen netto effect op de belangrijkste functionele soorten wel gereduceerd zijn, maar dat dit wordt gecompenseerd door een hogere biomassa en activiteit van andere soorten die minder gevoelig zijn of zich mogelijk hebben aangepast aan de verontreiniging.

De in het lab van GeoDelft gereinigde grond met 2000 mg kg⁻¹ olieresidu (R) had wel een zeer negatief effect op het aantal nematoden (Fig. 2c) en in mindere mate op de amoeben (Fig. 2b). Normaal zijn er enkele duizenden nematoden per 100 g grond, terwijl in dit monster maar 100 werden gevonden. Er waren helaas geen replicaties om dit effect statistisch te toetsen. De microbiële biomassa en activiteit, en de N mineralisatie in dit monster waren niet sterk gereduceerd.

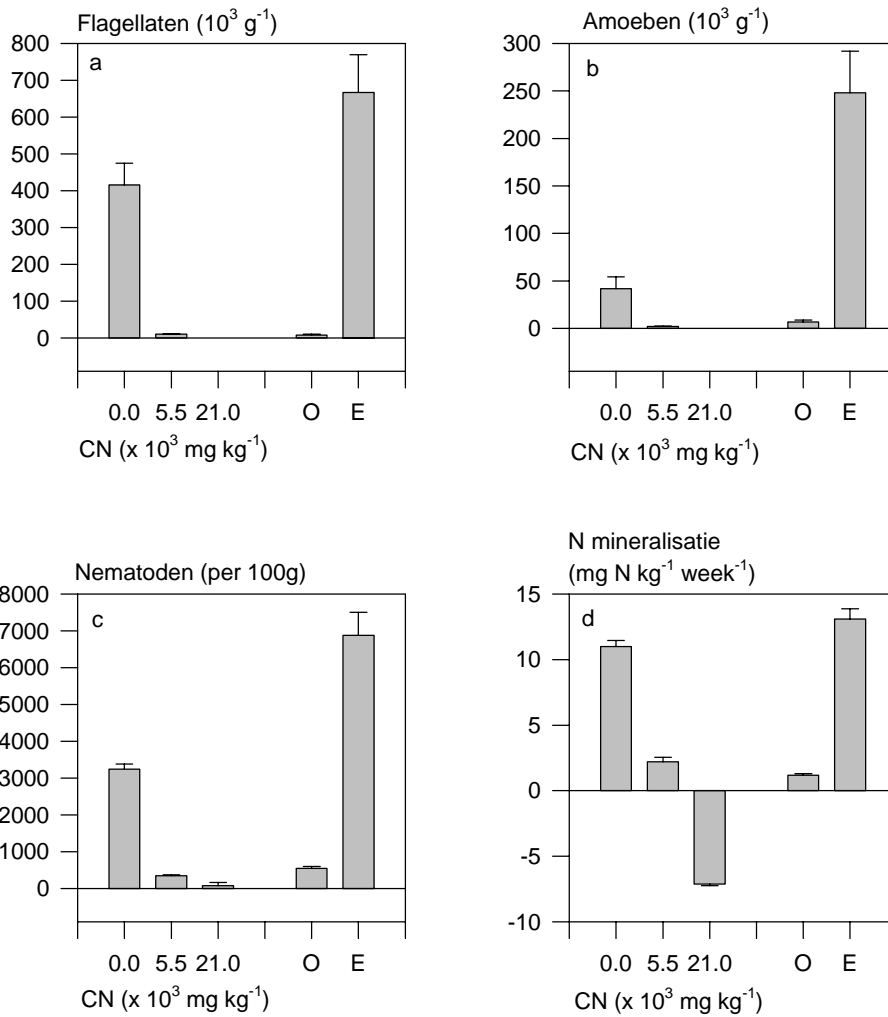
Resultaten gasfabriek

Alle gemeten parameters waren in de “matig” (5500 mg CN kg⁻¹) en zwaar (21000 mg CN kg⁻¹) verontreinigde grond van het gasfabrieksterrein veel lager dan in de schone grond (Fig. 3 en 4). Alle verschillen tussen schoon en verontreinigd waren statistisch significant ($P < 0.01$). De biomassa van de bacteriën was in de matig verontreinigde grond de helft van die in de schone grond. In de meest vervuilde grond konden geen bacteriën worden gemeten omdat deze grond een buitengewoon hoge achtergrondkleuring gaf. Hierdoor waren eventueel aanwezige bacteriën niet goed meer te zien. De bacteriële groeisnelheid gemeten als thymidine en leucine inbouw in DNA en eiwitten (Fig. 3b,c) en de aantallen protozoën (Fig. 4a,b) waren al bij de “matig” verontreinigde grond gereduceerd tot vrijwel nul, terwijl de bodemademhaling en de N mineralisatie waren gereduceerd tot respectievelijk 30% en 20% van de waarden in de schone grond. In de schone entgrond bestond 50% van de minerale N uit NO₃. In de matig verontreinigde grond was dit 30%. Dit wijst erop dat de nitrificerende bacteriën niet waren uitgeschakeld door de verontreiniging. In de meest verontreinigde grond waren alle organismen en processen uitgeschakeld. De sterke immobilisatie van minerale N (negatieve mineralisatie, Fig. 4d) in de meest verontreinigde grond had daarom waarschijnlijk geen biologische oorzaak.

In de schone grond van het gasfabrieksterrein bereikten de organismen en processen ongeveer dezelfde waarden als in de controlegrond (E) afkomstig uit de bovengrond (0-10 cm) van de Bovenbuurt. Dit in tegenstelling tot de schone grond van de EPON locatie (6 m diepte) waarin de biomassa en activiteit uiterst laag bleven bij de eerste microcosmosproef (Fig. 1 en 2). Daarom werd bij de tweede microcosmosproef ook een controle meegenomen met schone ondergrond van de Bovenbuurt afkomstig van circa 80 cm diepte. Ook in deze ondergrond (O) bleek het bodemvoedselweb zich slecht te ontwikkelen en wees de lage bodemademhaling erop dat er minder dan 20% van het toegevoegde luzernemeel werd verademd. De bij het openten toegevoegde organismen overleefden wel, maar vermeerderden zich niet. Omdat beide ondergronden schoon waren moet de erg lage biologische activiteit zijn bepaald door de bodemeigenschappen. Mogelijk speelt het zeer lage organische stof gehalte op grotere diepte een rol. Dit was 0.2% voor de schone EPON grond en 0.75% voor de ondergrond van de Bovenbuurt. De bovengrond van de Bovenbuurt en de schone grond van de gasfabriek hadden gehalten van respectievelijk 5.7 en 11% organische stof. Dit onderstreept nog eens dat referentiegegevens afkomstig moeten zijn uit bodems met dezelfde eigenschappen als de te onderzoeken bodems.



Figuur 3. Bacteriële biomassa (a), thymidine inbouw (maat voor DNA-synthese en groeisnelheid) (b), leucine inbouw (maat voor eiwitsynthese) (c) en ademhaling (d) in grond met toenemende concentraties van o.a. cyaniden (CN), PAK en minerale olie. De ondergrond (O) en bovengrond van de entgrond (E) zijn gebruikt als schone referenties. De foutenbalken geven de standaard fout ($n=3$, behalve voor a waar $n=9$).



Figuur 4. Aantallen flagellaten (a) amoeben (b), nematoden (c) en de stikstofmineralisatie (d) in grond met toenemende concentraties van o.a. cyaniden (CN), PAK en minerale olie. De ondergrond (O) en bovengrond van de entgrond (E) zijn gebruikt als schone referenties. De foutenbalken geven de standaard fout ($n=3$).

Bij de openting werden naar schatting 200-400 nematoden per 100 g (vochtige) grond toegevoegd. In de schone grond van de gasfabriek en de bovengrond van de Bovenbuurt waren de nematoden na twee maanden toegenomen tot respectievelijk 2550 en 5710 per 100 g vochtige grond (in Fig. 4c staan de aantallen per 100 g droge grond). Deze sterke toename werd veroorzaakt door bacterivore *Cephalobidae*, *Plectidea* en *Rhabditidae*. In de matig verontreinigde grond van de gasfabriek en in de ondergrond van de Bovenbuurt werden na 2 maanden incubatie respectievelijk 300 en 485 nematoden per 100 g gevonden. Dit zijn ongeveer evenveel als er werden toegevoegd, en wijst op overleving zonder reproductie. In de zwaar verontreinigde grond werden na de incubatie maar 65 nematoden per 100 g grond teruggevonden, wat wijst op directe toxische effecten. In deze grond werden slechts 9 taxa gevonden, terwijl in alle andere gronden ongeveer 20 taxa voorkwamen. Van de circa 200 herbivore nematoden per 100g grond die werden toegevoegd werden slechts 5 per 100 g teruggevonden. Fungivoren en Omnivoren/Predatoren ontbraken geheel in de zwaar verontreinigde grond. Omdat in de eerste microcosmosproef met EPON grond geen microarthropoden tot ontwikkeling kwamen, werden in de tweede proef met grond van de gasfabriek de potten opgeënt met enkele exemplaren van de springstaart *Folsomia candida*, gekweekt en beschikbaar gesteld door Aquasense. Deze bleken in de schone grond goed te groeien en na twee maanden incubatie werden gemiddeld 59 ± 7.9 (\pm standaard fout, $n = 3$) exemplaren per pot gevonden. In de matig verontreinigde grond werden slechts 19 ± 7.1 per pot gevonden, en in de zwaar verontreinigde grond werd geen enkel exemplaar teruggevonden.

Conclusies

In de met olie verontreinigde grond ontwikkelde zich een goed functionerend bodemvoedselweb met normale aantallen bacteriën, protozoën en nematoden, en een normale koolstof- en stikstof mineralisatie. In één in het lab gereinigd grondmonster met olieresidu (R) was de microbiële activiteit wel normaal maar bleken de aantallen nematoden extreem laag te zijn. Hiervan was te weinig grond beschikbaar voor replicaties en statistische toetsing. Daarom blijft er twijfel over mogelijke negatieve effecten van olieresiduen op bodemfauna.

In de verontreinigde grond van de gasfabriek functioneerde het bodemvoedselweb niet of nauwelijks. Alle gemeten organismen en processen waren vrijwel uitgeschakeld. Nematoden konden in de matig verontreinigde grond wel overleven maar zich niet vermeerderen. In de zwaar verontreinigde grond wees een sterke afname van de aantallen nematoden op directe toxische effecten.

In de schone grond van de gasfabriek kwamen de gemeten waarden goed overeen met die in de bovengrond (0-10 cm) van een schone referentie, de Bovenbuurt bij Bennekom. De waarden in de schone grond van de EPON locatie, afkomstig van 6 meter diepte, waren erg laag en vergelijkbaar met die in de ondergrond (80 cm diepte) van de Bovenbuurt. Dit onderstreept nog eens dat alleen bodems met dezelfde bodemeigenschappen geschikt zijn als referentie.

Referenties

- Bloem, J., G. Lebbink, K.B. Zwart, L.A. Bouwman, S.L.G.E. Burgers, J.A. de Vos and P.C. de Ruiter. 1994. Dynamics of microorganisms, microbivores and nitrogen mineralisation in winter wheat fields under conventional and integrated management. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **51**, 129-143.
- Bloem, J., P.C. de Ruiter and L.A. Bouwman. 1997. Food webs and nutrient cycling in agro-ecosystems. In "Modern Soil Microbiology" (J.D. van Elsas, J.T. Trevors and E. Wellington, editors), pp. 245-278. Marcel Dekker Inc. New York.
- Bouwman, L.A., J. Bloem, P.H.J.F. van den Boogert, F. Bremer, G.H.J. Hoenderboom and P.C. de Ruiter. 1994. Short-term and long-term effects of bacterivorous nematodes and nematophagous fungi on carbon and nitrogen mineralization in microcosms. *Biology and Fertility of Soils* **17**, 249-256.