
SKB-project 6416
Nieuwe processen achterNA

Demonstratielocatie Eindhoven

20 februari 2008

Verantwoording

Titel	Nieuwe processen achterNA – Demonstratielocatie Eindhoven
Opdrachtgever	SKB
Projectleider	Frank Volkering
Auteur(s)	Frank Volkering, Boris van Breukelen (VU Amsterdam)
Uitvoering meet- en inspectiewerk	
Projectnummer	4426268
Aantal pagina's	21 (exclusief bijlagen)
Datum	20 februari 2008
Handtekening	

Colofon

Tauw bv
afdeling Bedrijven Bodem
Handelskade 11
Postbus 133
7400 AC Deventer
Telefoon (0570) 69 99 11
Fax (0570) 69 96 66

Dit document is eigendom van de opdrachtgever en mag door hem worden gebruikt voor het doel waarvoor het is vervaardigd met inachtneming van de rechten die voortvloeien uit de wetgeving op het gebied van het intellectuele eigendom. De auteursrechten van dit document blijven berusten bij Tauw. Kwaliteit en verbetering van product en proces hebben bij Tauw hoge prioriteit. Tauw hanteert daartoe een managementsysteem dat is gecertificeerd dan wel geaccrediteerd volgens:

- NEN-EN-ISO 9001
- Er zijn analyses uitgevoerd door het NEN-EN-ISO 17025 geaccrediteerde milieulaboratorium van AL-West

Inhoud

Verantwoording en colofon	3
1 Inleiding.....	5
1.1 Achtergrond SKB-project.....	5
1.2 Conceptueel model van de locatie	6
1.2.1 Bodemopbouw en geohydrologie.....	6
1.2.2 Condities voor natuurlijke afbraak	6
1.2.3 Verontreinigingen en afbraakproducten	7
2 Werkzaamheden	9
3 Resultaten en discussie	10
3.1 CKW en afbraakproducten	10
3.2 Isotopen analyses	10
3.2.1 Achtergrond.....	10
3.2.2 Resultaten en discussie	11
3.3 DNA analyses.....	14
3.3.1 Achtergrond.....	14
3.3.2 Resultaten en discussie	15
4 Conclusies	17
4.1 Locatiespecifieke conclusies	17
4.2 Generieke conclusies	18

Bijlage(n)

1. Overzicht resultaten chemische analyses
2. Rapportage DNA analyses

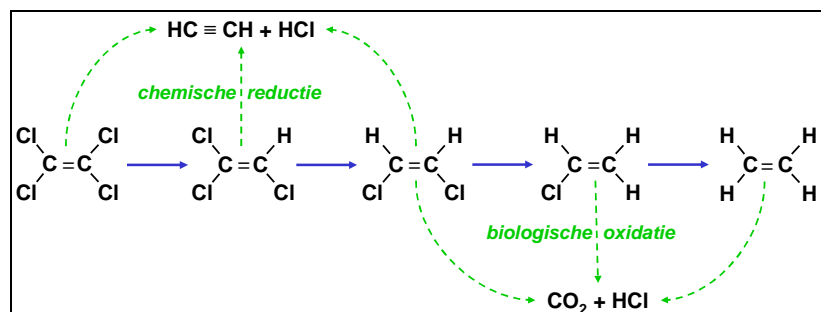
1 Inleiding

De demonstratielocatie Eindhoven is één van de zes demonstratielocaties in het SKB-project Nieuwe processen achterNA.

1.1 Achtergrond SKB-project

Onderzoek naar de natuurlijke afbraak van chloorkoolwaterstoffen (CKW) zoals Per en Tri is doorgaans gericht op het aantonen van biologische reductieve dechlorering. Uitgebreide praktijkervaring heeft geleerd dat in ongeveer de helft van de gevallen de reductieve afbraak van Per niet volledig verloopt en blijft steken bij *cis*-dichlooretheen (Cis) of, minder vaak, bij vinylchloride (VC). Omdat deze afbraakproducten mobieler en toxischer zijn dan de uitgangsubstanties, lijkt NA geen toepasbare aanpak voor deze gevallen.

Uit betrouwbaar wetenschappelijk onderzoek is bekend dat er naast biologische reductieve dechlorering ook andere processen een rol kunnen spelen bij de natuurlijke anaërobe afbraak van CKW. Figuur 2 geeft een overzicht van deze “nieuwe” NA-processen.



Figuur 1.1: bekende (blauw) en nieuwe (groen, gestippeld) NA-processen voor Per en Tri

Het feit dat processen theoretisch kunnen optreden wil niet zeggen dat ze een significante rol spelen onder natuurlijke condities. Toch wordt er regelmatig gespeculeerd over het optreden van alternatieve NA-mechanismen, bv. wanneer blijkt dat een *Cis*-pluim kleiner is dan verwacht op basis van modellering.

In 2006 is het SKB-project “Nieuwe processen achterNA” van start gegaan waarin een toolbox wordt ontwikkeld om de nieuwe NA-processen aan te tonen. De belangrijkste methode die is onderzocht, is stabiele koolstofisotopen analyse, een nog relatief onbekende methode die echter sterk bewijs voor veel verschillende afbraakprocessen kan leveren. Daarnaast is het ontstaan van tussen- en eindproducten van chemische reductie onderzocht.

Vervolgens is de ontwikkelde toolbox toegepast op zes demonstratielocaties met als doel om de toolbox te testen én om het belang van de nieuwe NA-processen te onderzoeken.

Deze rapportage beschrijft de demonstratielocatie Eindhoven.

1.2 Conceptueel model van de locatie

De locatie Eindhoven betreft een voormalige industriële locatie waar tot de jaren negentig op verschillende plaatsen CKW als ontvettingsmiddel zijn gebruikt. Dit heeft geleid tot meerdere grondwaterverontreinigingen. Deze studie richt zich op een omvangrijke grondwaterverontreiniging die is veroorzaakt door lekkage van Tri. Figuur 1.2 geeft een bovenaanzicht van de locatie met de bemonsterde peilbuizen. Deze en andere peilbuizen worden sinds 2002 periodiek bemonsterd op CKW, afbraakproducten en redoxparameters.

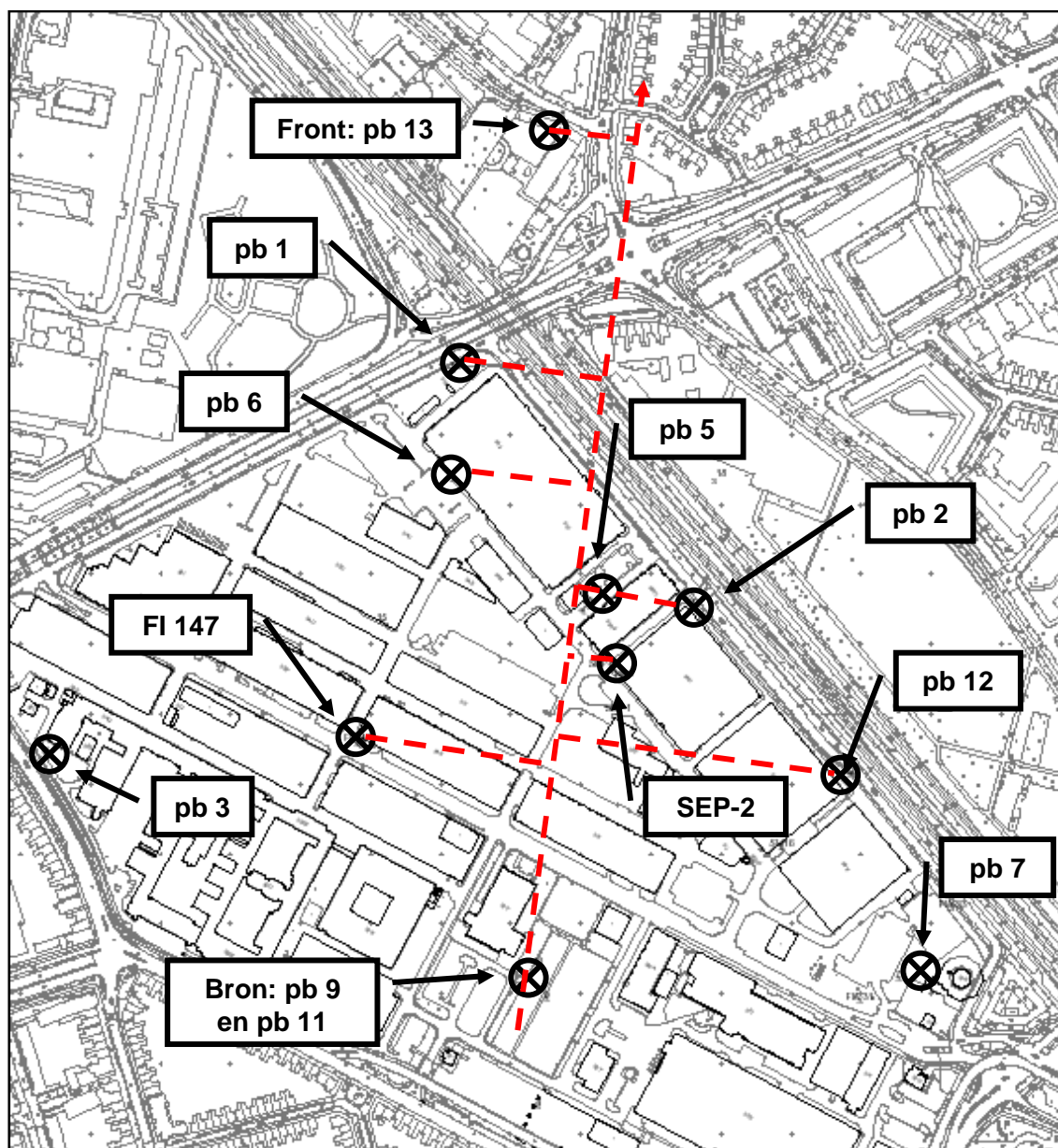
1.2.1 Bodemopbouw en geohydrologie

De bovenste 27 meter van de bodem wordt gevormd door het Nuenen pakket, een heterogeen pakket bestaande uit lemige en matig doorlatende zandige lagen. De geschatte horizontale grondwaterstromingsnelheid is 1,5 - 3 m/jaar; de infiltratiesnelheid wordt geschat op 0,25 - 5 m/jaar. Daaronder bevindt zich tot op grote diepte de formatie van Sterksel, een goed doorlatend zandig pakket met een geschatte horizontale stromingsnelheid van 37 m/jaar.

In het verleden hebben op het terrein meerdere grondwateronttrekkingen plaatsgevonden. Momenteel wordt de grondwaterstroming alleen nog beïnvloed door een drinkwaterwinning noordelijk van de locatie. De huidige richting van de grondwaterstroming is globaal noordnoordoost.

1.2.2 Condities voor natuurlijke afbraak

Het instromende grondwater is op alle gemeten dieptes (11 tot 91 m –mv) vrij arm aan organisch stof en daardoor matig anaëroob. IJzerreductie lijkt het dominante redoxproces en lokaal treedt nitraatreductie op. Dit is een ongunstige situatie voor natuurlijke afbraak van CKW en hierbij treedt typisch ophoping van Cis op door de afwezigheid van (voldoende) bacteriën die Cis kunnen omzetten naar etheen. Direct stroomafwaarts van de bronzone verandert dit beeld. Hier is het grondwater duidelijk sterker anaëroob en treden sulfaatreductie en methanogenese op. Op een aantal plaatsen worden duidelijk verhoogde DOC-gehalten gevonden. Verder stroomafwaarts (pb 1, 13) komt de verontreiniging in de formatie van Sterksel. Hoewel dit zandige pakket minder rijk aan organisch stof is, duiden de redoxparameters er op dat ook hier gunstige, strikt anaërobe condities heersen.



Figuur 1.2 bovenaanzicht locatie en bemonsterde peilbuizen. De rode stippelijn geeft een projectie van de meetpunten op een centrale as.

1.2.3 Verontreinigingen en afbraakproducten

In de bronzone, nabij de peilbuizen 9 en 11, zijn tot een op diepte van 19 meter zeer hoge concentraties aan Tri en Cis aangetroffen die bewijs vormen voor de aanwezigheid van puur product. Nabij SEP-2 is sprake van een tweede, ondiepere bronzone, waar vooral Per voorkomt.

De grondwateronttrekkingen op het terrein hebben een sterke invloed op de verspreiding van de verontreinigingen. De voornaamste verspreiding heeft plaatsgevonden in noordnoordoostelijke richting, maar er is ook verspreiding in oostelijke en westelijke richting opgetreden. Hier wordt verder vooral de verspreiding in noordnoordoostelijke richting behandeld, zie de centrale as in figuur 1.2.

Stroomafwaarts van de bron in de peilbuizen 5 en 12 komen de hoogste concentraties voor op een diepte van ca. 20 m -mv. Hier is wordt geen Tri meer aangetroffen. Cis en VC zijn aanwezig in de hoogste concentraties; etheen en etheen zijn in significante mate aanwezig. Verder stroomafwaarts (pb 11, 6) ligt het zwaartepunt van de pluim in de bovenkant van de formatie van Sterksel, op ca 30 m -mv. Hier is VC de dominante verontreiniging en wordt veel etheen en ethaan aangetroffen.

Aan het front van de pluim in pb 13 komen vrijwel alleen nog VC en etheen voor. Op basis van de molverhoudingen tussen VC en etheen+ethaan kan worden berekend dat 95-98% van het VC is omgezet in onschadelijke eindproducten. Wel is het zo dat de VC-concentratie hier nog boven de interventiewaarde ligt. Het is daarom van belang dat kan worden aangetoond dat de afbraak ook aan het front verder gaat.

2 Werkzaamheden

De praktische werkzaamheden in dit project bestonden uit het bemonsteren van grondwater en het uitvoeren van analyses. De tabel hieronder geeft een lijst van de meetpunten die bemonsterd zijn.

Tabel 2.1: monsternamenpunten voor het SKB-project

peilbuis	VU code	filterdiepte (m –mv)		
1	4	10	20	30* #
2		-	20#	30
3		-	20	30
5	7	21*	31	-
6	6	24	30*	47
7	9	17* #	32	47
9	1	19*	30	45
11	2	60	73*	-
12	5	21*	30	-
13	8	-	35,5* #	44* #
SEP-2	3	9*	-	-
FIA-147		-	-	19*

Van alle meetpunten zijn door het AL West laboratorium in Deventer monsters geanalyseerd op chloorethenen en de afbraakproducten ethen, ethaan en methaan. Daarnaast is een screening op vluchtige koolwaterstoffen uitgevoerd om de vorming van andere afbraakproducten te onderzoeken, waaronder acetyleen (ethyn). Bij de monsterpunten gemerkt met * is door TNO Ruimte en Ondergrond in Utrecht stabiele koolstofisotopen analyse op de aanwezige CKW uitgevoerd.

Bij de monsterpunten gemerkt met # zijn parallel aan de bovenstaande analyses door VITO in Mol DNA analyses uitgevoerd. Hoewel deze analyses niet in het kader van het SKB-project zijn uitgevoerd, leveren ze relevante informatie over natuurlijke afbraak en zijn daarom in deze rapportage meegenomen.

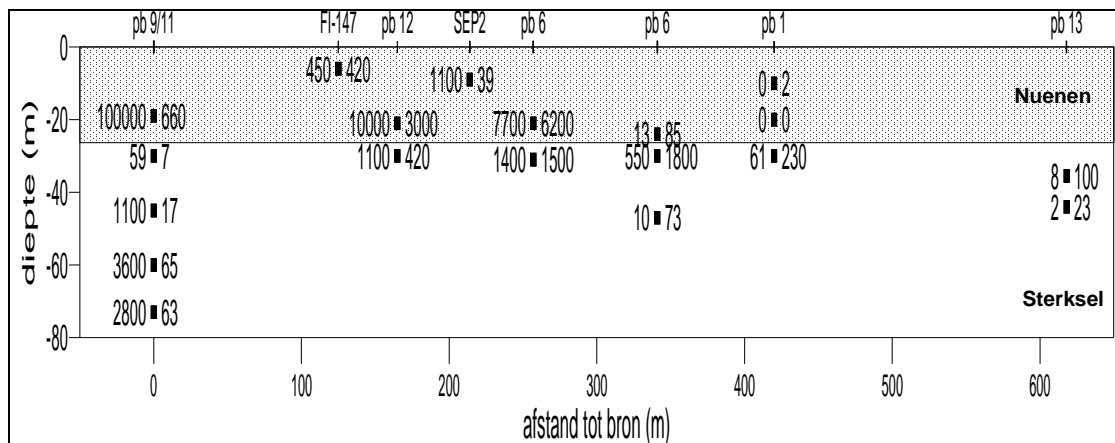
De interpretatie van de resultaten is uitgevoerd door Tauw in samenwerking met de Vrije Universiteit Amsterdam en TNO Ruimte en Ondergrond. Voor de isotopen resultaten is hiervoor gebruik gemaakt van een 1-D rekenmodel waarmee transport, afbraak en isotopenfractionering van CKW kan worden beschreven. De resultaten van de DNA-analyses zijn geïnterpreteerd door VITO.

3 Resultaten en discussie

3.1 CKW en afbraakproducten

De resultaten van de analyse op chloorethenen, etheen, ethaan, methaan en van een screening op de aanwezigheid van alternatieve afbraakproducten zijn gegeven in Bijlage 1.

De gemeten concentraties aan CKW, etheen, ethaan en methaan zijn in grote lijnen in overeenstemming met wat in eerdere monitoringsrondes op de locatie is aangetroffen en bevestigen dus het in hoofdstuk 1 opgenomen conceptuele model. In figuur 3.1 is een schematische dwarsdoorsnede van de pluim gegeven, met daarin de gemeten concentraties aan Cis en VC.



Figuur 3.1 Schematische dwarsdoorsnede van de verontreinigingspluim. Links van het meetpunt de concentratie Cis, rechts van het meetpunt de concentratie VC in µg/l

Er zijn geen andere vluchtige organische stoffen aangetroffen die kunnen worden aangemerkt als afbraakproducten van Per of Tri.

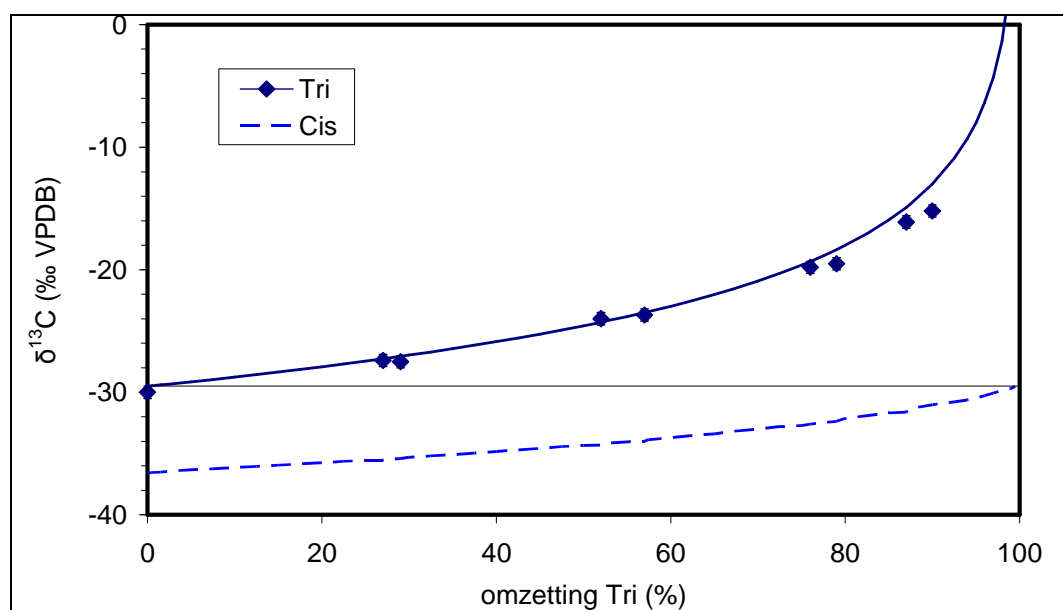
3.2 Isotopen analyses

3.2.1 Achtergrond

Alle koolstof, dus ook de koolstof in CKW, bestaat van nature uit twee stabiele isotopen: ^{12}C (98,9%) en ^{13}C (1,1%). Bij afbraakprocessen worden CKW-moleculen die een ^{13}C -atoom bevatten iets langzamer omgezet dan CKW die alleen uit ^{12}C bestaan. Het gevolg is dat de resterende CKW meer ^{13}C zal bevatten naarmate er meer afbraak is opgetreden. Dit wordt isotopenfractionering genoemd en is in Figuur 3.2 hieronder weergegeven voor de biologische afbraak van Tri tot Cis. Omdat andere, niet-destructieve processen zoals verdunning, verdamping

en binding aan de bodem geen fractionerend effect hebben, vormt isotopenfractionering doorslaggevend bewijs voor het optreden van afbraak.

De mate van isotopenfractionering verschilt per proces en wordt gekarakteriseerd via de fractioneringsfactor. Uit wetenschappelijk onderzoek is bekend wat de ranges van fractioneringsfactoren zijn die behoren bij de verschillende afbraakstappen.



Figuur 3.2 Voorbeeld van het verloop van het ^{13}C -gehalte van Tri en Cis als functie van de mate van omzetting van Tri met een initiële $\delta^{13}\text{C}$ -waarde van -30‰ .

Hoewel de theorie achter isotopen fractionering relatief eenvoudig is, is de interpretatie van de resultaten bij CKW-verontreinigingen complex omdat er sprake is van een sequentiële afbraak waarbij elke afbraakstap een sterker fractionerend effect heeft en omdat de verschillende stoffen verschillende transportsnelheden hebben. Om de interpretatie mogelijk te maken, hebben Tauw en de VU een rekenmodel ontwikkeld waarmee transport, afbraak en isotopenfractionering van CKW kunnen worden beschreven. Dit model is beschreven in een artikel dat in 2005 is gepubliceerd (Van Breukelen et al., Environmental Science & Technology 39(11): 4189-4197).

3.2.2 Resultaten en discussie

De resultaten van de analyses op CKW en die van de isotopen analyses die zijn uitgevoerd zijn gegeven in tabel 3.1.

Uit de isotopensignatuur van de CKW in de bronzone (pb 9 en 11) blijkt dat het gaat om een verontreiniging die oorspronkelijk met name uit Tri bestond. Het aangetroffen Per is mogelijk als "verontreiniging" in het gebruikte Tri aanwezig geweest. Het Tri in de bronzone is vrij sterk

aangerijkt als gevolg van natuurlijk omzetting tot Cis. Op basis van de ^{13}C -gehaltenes en de concentraties aan Tri en Cis in deze filter kan met redelijke betrouwbaarheid berekend worden dat de oorspronkelijke $\delta^{13}\text{C}$ -waarde van het gebruikte Tri tussen de -22 en de -25‰ ligt, hetgeen in de normale range van Tri (-24 tot -32‰) ligt. Bij de berekeningen is uitgegaan van Tri met een oorspronkelijke $\delta^{13}\text{C}$ van -23,5‰.

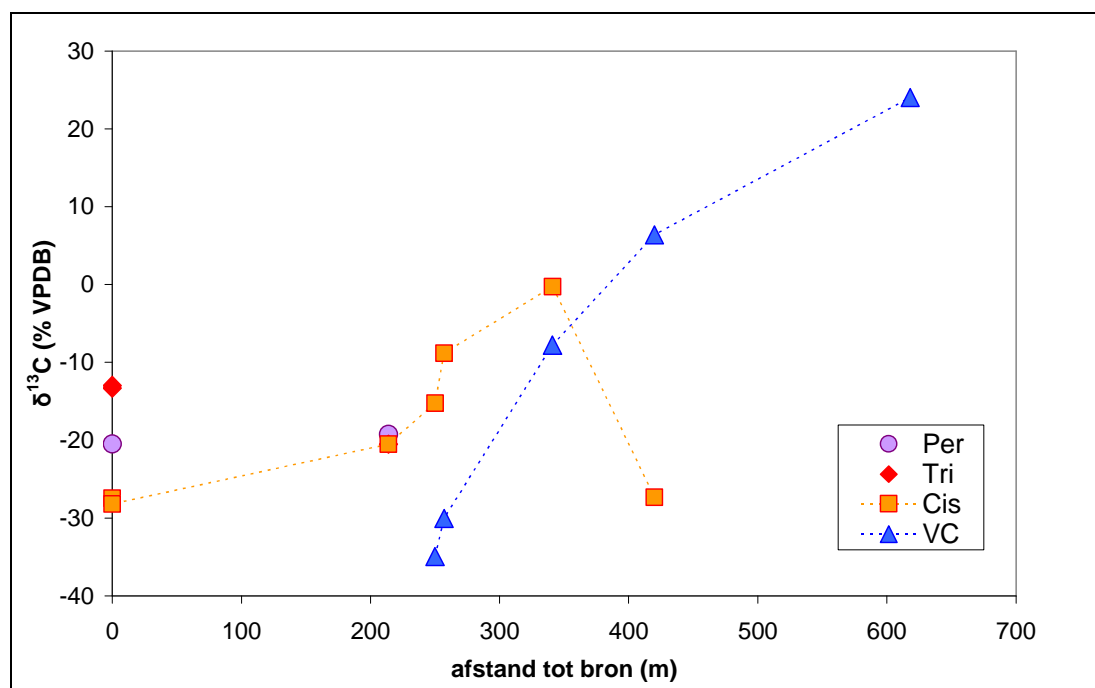
Bij pb SEP2 wordt op vrij geringe diepte (9 m –mv) Per aangetroffen. Dit is vrijwel zeker gerelateerd aan een andere verontreinigingsbron.

Tabel 3.1 Concentraties ($\mu\text{g/L}$) en ^{13}C -gehaltenes (‰ VPDB) van CKW in grondwater

code	omschrijving	Per		Tri		Cis		VC	
		conc.	$\delta^{13}\text{C}$	conc.	$\delta^{13}\text{C}$	conc.	$\delta^{13}\text{C}$	conc.	$\delta^{13}\text{C}$
9-19	bron	1.600	-20,49	55.000	-12,97	100.000	-27,49	660	
9-30	bron	<dl		43		59		7	
9-45	bron diep	<dl		370		1.100		17	
11-60	bron diep	<dl		410		3.600		65	
11-73	bron diep	<dl		500	-13,33	2.800	-28,19	63	
FI-147-6	pluim	<dl		<dl		450		420	
SEP2 -9	2e bron	9.800	-19,24	2.500	-20,52	1.100	-21,70	39	
12-21	pluim	<dl		<dl		10.000	-15,25	3.000	-34,95
12-30	pluim	<dl		<dl		1.100		420	
2-30	pluim	<dl		<dl		0		4	
5-21	pluim	<dl		<dl		7.700	-8,83	6.200	-30,05
5-31	pluim	<dl		<dl		1.400		1.500	
6-24	pluim	<dl		<dl		13		85	
6-30	pluim	<dl		<dl		550	-0,26	1.800	-7,79
6-47	pluim	<dl		<dl		10		73	
1-10	pluim	29		<dl		<dl		2	
1-20	pluim	<dl		<dl		<dl		<dl	
1-30	pluim	<dl		<dl		61	-27,33	230	+6,39
13-35.5	front	<dl		<dl		8		100	+24,02
13-44	front	<dl		<dl		2		23	
3-20	pluim lateraal	<dl		<dl		1.800		1.000	
3-30	pluim lateraal	<dl		<dl		18.000		410	
7-17	pluim lateraal	<dl		<dl		190	+18,61	2.200	-6,88
7-32	pluim lateraal	<dl		<dl		87		65	
7-47	pluim lateraal	<dl		<dl		4		130	

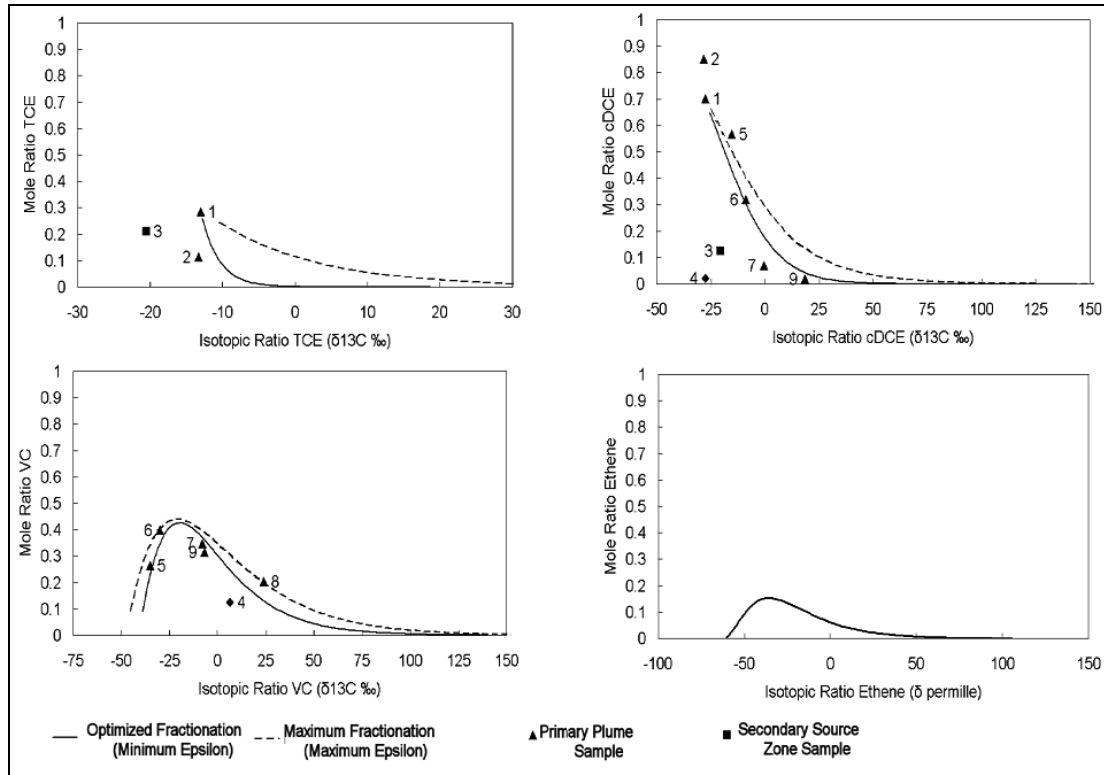
Stroomafwaarts van de beide bronzones komen voornamelijk Cis, VC en de onschadelijke eindproducten etheen en ethaan voor. Voor zowel Cis als VC worden $\delta^{13}\text{C}$ -waarden gevonden die duidelijk boven die van de uitgangproducten (Tri, Per) liggen (Figuur 3.3), wat aanvullend bewijs vormt dat er afbraak van deze stoffen optreedt. De continue stijging van het ^{13}C -gehalte

van VC met de afstand tot de bronzone vormt eenduidig bewijs voor de voortgaande afbraak ervan.



Figuur 3.3 ^{13}C -gehaltes van Per, Tri, Cis en VC als functie van de afstand van het monsterpunt in de centrale stroombaan tot de primaire bronzone (pb 9/11).

Aan de Vrije Universiteit Amsterdam zijn de gegevens uit tabel 3.2 gemodelleerd. Ondanks het beperkte aantal analyse in de centrale stroombaan bleek het mogelijk een goede beschrijving van de gegevens te verkrijgen door uit te gaan van reductieve dechlorering als afbraakproces. In figuur 3.4 zijn de resultaten van de beste fit weergegeven. Voor isotopenfractionering zijn de waarden in het artikel van Van Breukelen et al (2005) gebruikt. De beste halfwaardetijden zijn: Tri 0,7 jaar; Cis 1,0 jaar en VC 1,7 jaar⁻¹.



Figuur 3.4 Simulatie van reductieve dechlorering. Lijnen zijn gesimuleerde waarden, symbolen zijn waarnemingen; de nummers corresponderen met de VU-codes in tabel 2.1. Driehoeken zijn de monsters behorende bij de primaire pluim; monsterpunt 3 (SEP-2) behoort hier niet toe.

3.3 DNA analyses

3.3.1 Achtergrond

Er zijn verschillende soorten bacteriën die Tri en Per kunnen omzetten tot Cis. Tot dusver is er echter slechts één bacteriesoort bekend die Cis verder kan omzetten naar VC en etheen: *Dehalococcoides sp.*. Het is bekend dat deze strikt anaërobe bacterie niet overal voorkomt en dat er meerdere soorten zijn, die niet allemaal in staat zijn volledige afbraak van Cis uit te voeren. Via analyse van 16S rRNA is het mogelijk om vast te stellen of *Dehalococcoides* bacteriën in grond of grondwater voorkomen.

Uit wetenschappelijk onderzoek zijn DNA-sequenties bekend geworden die specifiek zijn voor enzymen die betrokken zijn bij de verschillende stappen van reductieve dechlorering. Met name vinyl chloride reductase (VC reductase) is relevant omdat dit enzym de laatste schadelijke verbinding uit de afbraakroute omzet. Er zijn op dit moment twee soorten VC reductase bekend: *vcrA* en *bvcA*. Wanneer er in een bodemonster een significante

hoeveelheid van het DNA dat voor een van deze twee enzymen codeert wordt aangetroffen, is dit doorslaggevend bewijs dat er op dat monsterpunt afbraak tot etheen kan optreden.

3.3.2 Resultaten en discussie

De volledige rapportage van VITO met de resultaten van de DNA analyses zijn te vinden in Bijlage 2. Tabel 3.2 geeft een samenvatting van de resultaten.

Tabel 3.2 resultaten DNA analyses

code	omschrijving	concentratie (µg/L)				DNA		
		Per	Tri	Cis	VC	16S rRNA	<i>vcrA</i> ⁺ DNA	<i>bvcA</i> ⁺ DNA
2-20	pluim	<dl	<dl	1	100	-	-	-
1-30	pluim	<dl	<dl	61	230	+	+	-
13-35,5	front	<dl	<dl	8	100	-	-	-
13-44	front	<dl	<dl	2	23	-	-	-
7-17	pluim lateraal	<dl	<dl	190	2.200	+	+	+/-

Uit tabel 3.2 blijkt dat er in twee van de vijf grondwatermonsters DNA dat codeert voor VC-reductase aanwezig is (pb 1-30 en pb 7-17). In het sterkst verontreinigde monster worden beide types VC reductase DNA aangetroffen. Meetpunt 1-30 bevindt zich in de formatie van Sterksel. In de overige drie monsters is dit DNA niet aangetroffen, waaronder de twee meetpunten het meest aan het front.

Hierbij is het van belang op te merken dat de DNA analyse kwalitatief is en dat de detectielimiet enigszins onzeker is. Een positief signaal betekent dat het DNA aanwezig is, maar een negatief signaal betekent niet dat het met zekerheid afwezig is. Omdat aan het front van de pluim relatief lage VC concentraties voorkomen, is het zeer goed mogelijk dat er onvoldoende micro-organismen met het VC-reductase DNA zijn om detectie mogelijk te maken. Omdat één van de meetpunten waar wel VC-reductase DNA is aangetoond zich bevindt in de zelfde bodemlaag (formatie van Sterksel) als waar het front van de pluim zich bevindt, kan worden geconcludeerd dat er geen belemmering is voor het optreden van verdere VC-afbraak aan het front van de pluim.

4 Conclusies

4.1 Locatiespecifieke conclusies

In het grondwater van de demonstratielocatie Eindhoven bevindt zich een omvangrijke verontreiniging met CKW. Er vindt reeds meerdere jaren periodieke bemonstering en analyse van grondwater uit een aanzienlijk aantal meetpunten plaats. Uit resultaten van de analyses op CKW, afbraakproducten en redoxparameters blijkt duidelijk dat er in het grondwater volledige natuurlijke reductieve dechlorering optreedt. Aan het front van de bekende pluim in het watervoerende pakket komen vooral VC en etheen voor. Hoewel er hier sterke VC-afbraak is opgetreden (95-98% op basis van concentraties), zijn de VC concentraties nog dermate hoog dat het nodig is aan te tonen dat verdere afbraak optreedt.

In deze studie is aanvullend onderzoek gedaan naar het optreden van natuurlijke afbraak in de CKW-verontreiniging in het grondwater op de demonstratielocatie Eindhoven. Hierbij zijn naast de standaardmatige analyse op CKW en afbraakproducten van biologische dechlorering op een deel van de monsters de volgende analyses uitgevoerd:

- GC-MS screening op alternatieve afbraakproducten
- Componentspecifieke stabiele koolstof isotopen analyse op de aanwezige CKW
- Analyse op DNA dat codeert voor vinylchloride reductase.

Naast biologische reductie kan er onder anaërobe condities ook chemische reductie van Per, Tri en Cis optreden. In het grondwater zijn geen vluchtige componenten zoals acetyleen gedetecteerd die erop wijzen dat chemische reductie in dit geval een significante rol speelt.

De uitgevoerde stabiele koolstofisotopen analyses vormen een onafhankelijke bewijslijn die het optreden van volledige natuurlijke biologische reductieve dechlorering bevestigt. Bovendien leveren de analyses eenduidig bewijs dat er tussen de twee meest stroomafwaartse meetpunten in het watervoerende pakket (pb 1-30 en pb 13-35) nog duidelijk verdere omzetting van VC tot etheen heeft plaatsgevonden. De gevonden concentraties aan CKW en afbraakproducten en de en koolstofisotopen samenstelling van de CKW kunnen goed worden beschreven met een aan de Vrije Universiteit Amsterdam ontwikkeld stoftransportmodel waarin de lokale hydrologische gegevens zijn ingevoerd. Daardoor is het mogelijk een betrouwbare schatting van de afbraaksnelheden voor de verschillende CKW te geven. Uitgaande van eerst orde kinetiek zijn de volgende halfwaardetijden afgeleid: Tri 0,7 jaar, Cis 1,0 jaar en VC 1,7 jaar.

Stabiele isotopen analyse kan kwantitatief bewijs leveren dat afbraak is opgetreden, maar niet dat deze afbraak op een bepaald punt nog steeds optreedt. DNA-analyse is op dit moment het enige geschikte middel om dit te kunnen aantonen. Daarom is op een aantal meetpunten in de pluim

door het Belgische onderzoeksinstituut VITO DNA-analyse uitgevoerd. Hierbij is specifiek geanalyseerd op DNA dat codeert voor VC-reductase, het enzym dat verantwoordelijk is voor de omzetting van VC tot etheen. In een aantal monsters uit de pluim is dit DNA aangetoond, maar aan het front van de pluim is het DNA niet gevonden. Hierbij is het van belang op te merken dat de analyse kwalitatief is en dat de detectielimiet enigszins onzeker is. Een positief signaal betekent dat het DNA aanwezig is, maar een negatief signaal betekent niet dat het met zekerheid afwezig is. Omdat aan het front van de pluim relatief lage VC concentraties voorkomen, is het zeer goed mogelijk dat er onvoldoende micro-organismen met het VC-reductase DNA zijn om detectie mogelijk te maken. Omdat één van de meetpunten waar wel VC-reductase DNA is aangetoond zich bevindt in de zelfde bodemlaag (formatie van Sterksel) als waar het front van de pluim zich bevindt, kan worden geconcludeerd dat er geen belemmering is voor het optreden van verdere omzetting van VC tot etheen aan het front van de pluim.

4.2 Generieke conclusies

De locatie Eindhoven is de enige van de zes demonstratielocaties in het SKB-project 'Nieuwe processen achterNA' waar sterke, volledige dechlorering tot etheen optreedt. De gegevens van de stabiele isotopen analyses ondersteunen het bestaande beeld van de afbraakprocessen. Gebruik makend van normale parameterwaarden voor dechlorering en de bijbehorende isotopenfractionering kan het verloop van de concentraties en de koolstofisotopen fractionering van Cis en VC in de pluim goed worden beschreven en gekwantificeerd.

Door het dominante effect van reductieve dechlorering op de koolstofisotopensamenstelling van de verontreinigingen kunnen in dit geval op basis van de isotopen analyses geen uitspraken worden gedaan over het optreden van abiotische reductie of anaërobe oxidatie. Dit is een beperking van de methode, waarbij moet worden opgemerkt dat het belang van deze processen ondergeschikt is wanneer volledige reductieve afbraak tot etheen optreedt.

Een andere, meer algemene beperking van stabiele isotopen analyse is dat het geen informatie oplevert over het actuele optreden van afbraak. Een verschuiving van de isotopensamenstelling in een pluim of tussen twee meetpunten is bewijs dat in de pluim of tussen deze meetpunten afbraak is opgetreden, maar dat hoeft niet te betekenen dat dat op dit moment of bij de meest stroomafwaartse peilbuis nog steeds gebeurt. Wanneer, zoals in Eindhoven het geval is de verontreiniging stroomafwaarts terecht komt in een bodemlaag met potentieel minder goede omstandigheden voor afbraak, bestaat de kans dat isotopen analyse onvoldoende bewijs levert. De combinatie van isotopen analyse, waarmee kwantitatief kan worden aangetoond dat afbraak is opgetreden en DNA analyse, waarmee kan worden aangetoond dat de capaciteit voor volledige omzetting aanwezig is, kan dan het benodigde bewijs leveren.

Bijlage

1

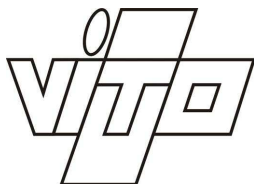
Overzicht resultaten chemische analyses

Peibuis	filterdiepte (m - mv)	locatie	Per (µg/l)	Tri (µg/l)	Cis (µg/l)	11DCE (µg/l)	Trans (µg/l)	VC (µg/l)	etheen (µg/l)	ethaan (µg/l)	acetyleen (µg/l)	Methaan (µg/l)
1	9 - 10	pluim	29	<2	<2	<2	<2	2,2	<2	21	<2	380
1	19 - 20	pluim	<2	<2	<2	6,4	<2	<2	<2	1.000	<2	11.000
1	29 - 30	pluim	<2	<2	61	<2	<2	230	410	320	<2	3.900
2	29 - 30	pluim	<2	<2	<2	<2	<2	3,6	<2	4,1	<2	56
3	19 - 20	pluim lateraal	<2	<2	1.800	3,8	<2	1.000	330	8,5	<2	200
3	30 - 31	pluim lateraal	<2	<2	18.000	37	32	410	45		<2	63
5	21 - 22	pluim	<2	<2	7.700	<2	<2	6.200	1.400	610	<2	7.600
5	32 - 32	pluim	<2	<2	1.400	25	<2	1.500	480	150	<2	1.500
6	24 - 25	pluim	<2	<2	13	<2	<2	85	18	36	<2	400
6	29 - 30	pluim	<2	<2	550	4	<2	1.800	1.300	56	<2	700
6	46 - 47	pluim	<2	<2	10	<2	<2	73	25	21	<2	270
7	16 - 17	pluim lateraal	<2	<2	190	<2	<2	2.200	1.400	740	<2	8.500
7	31 - 32	pluim lateraal	<2	<2	87	<2	<2	65	31	47	<2	480
7	46 - 47	pluim lateraal	<2	<2	4	<2	<2	130	30	68	<2	780
9	18 - 19	bron	1.600	55.000	100.000	370	470	660	<200	<200	<2	300
9	29 - 30	bron	<2	43	59	<2	<2	6,7	<2	<2	<2	13
9	44 - 45	bron	<2	370	1.100	7,9	6,4	17	<2	<2	<2	33
11	58 - 60	bron	<2	410	3.600	21	15	65	6,4	2,3	<2	80
11	71 - 73	bron	<2	500	2.800	30	15	63	5,3	<2	<2	100
12	20 - 21	pluim	<2	<2	10.000	540	6,7	3.000	420	470	<2	4.400
12	29 - 30	pluim	<2	<2	1.100	64	<2	420	73	130	<2	2.400
13	32 - 34	front	<2	<2	8	<2	<2	100	150	26	<2	550
13	41 - 43	front	<2	<2	2,2	<2	<2	23	16	16	<2	630
FI-147	5 - 6	pluim	<2	<2	450	28	<2	420	1.600	59	<2	390
SEP2	8 - 9	2e bron	9.800	2.500	1.100	12	8,1	39	2,2	11	<2	210

Bijlage

2

Rapportage DNA analyses



Detectie van *Dehalococcoides* species en de catabolische genen *vcrA* en *bvcA* in vijf grondwaterstalen

Winnie Dejonghe, Queenie Simons, Albert Bossus en Johan Gemoets

(MPT/L24BB/WdJ/wdj06-021)

November 2006

Situering:

Tauw heeft verzocht na te gaan of in 5 grondwaterstalen afkomstig van een met gechlloreerde alifatisch koolwaterstoffen (CAHs) verontreinigd terrein in Eindhoven bacteriën en afbraakgenen aanwezig zijn die CAHs kunnen afbreken. Via PCR-detectie met specifieke primer sets werd bij VITO onderzocht of bacteriën behorende tot het *Dehalococcoides* genus konden gedetecteerd worden (Löffler et al., 2000). *Dehalococcoides* species worden vaak in verband gebracht met biologische CAH-afbraak, waardoor ze als een soort indicator organisme worden beschouwd voor de mogelijkheid van grondwatersanering via anaërobe biologische dehalogenering.

Verder werd eveneens via PCR de aanwezigheid nagegaan van twee genen die coderen voor enzymen betrokken in de laatste stappen van de anaërobe afbraak van PCE tot etheen. Meer specifiek gaat het hier om de genen *vcrA* en *bvcA* die respectievelijk de omzetting van DCE en VC naar etheen coderen. Een overzicht van deze genen wordt gegeven in onderstaande figuur. De primers en PCR-condities die gebruikt werden zijn gebaseerd op de in Figuur 1 vermelde referenties, maar werden door VITO verder geoptimaliseerd.

PCE → TCE → cDCE → VC → ethene

***vcrA* gen** (van *Dehalococcoides* sp. strain VS die groeit op TCE, DCE, VC) – Müller et al., 2004

***bvcA* gen** (van *Dehalococcoides* sp. strain BAV1 die groeit op DCE, VC) - Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004

Figuur 1: Overzicht van de genen die gedetecteerd worden met de gebruikte specifieke catabolische primers. De rode streep boven het gen duidt aan welke stappen in de afbraak van PCE door het corresponderende enzyme worden gekatalyseerd.

Resultaten:

Een overzicht van de resultaten is gegeven in Tabel 1. Meer gedetailleerde informatie met betrekking tot de PCRs met specifieke primers zijn weergegeven in Figuur 2.

Uit de 5 grondwaterstalen werd DNA geïsoleerd. De kwaliteit van het DNA werd geverifieerd door een PCR met een algemene eubacteriële primer. Voor alle vijf de stalen werd kwalitatief goed DNA bekomen.

Met de *Dehalococcoides* primer werd een positief signaal bekomen in twee van de vijf stalen, nl. pb1-4 en pb 7-1. Enkel in deze 2 stalen werd ook het *vcrA* gen duidelijk gedetecteerd. Voor het *bvcA* gen werd slechts een zeer licht PCR-sigitaal bekomen en dit enkel in het staal pb 7-1.

In de stalen pb 2-3, 13-2 en 13-3 werden geen PCR signalen bekomen voor primers specifiek voor het *Dehalococcoides* 16S rRNA gen en de catabolische genen *bvcA* en *vcrA*. Wel bleek dat het 16S rRNA gen van de Eubacteriële gemeenschap wel kon worden gedetecteerd. Dit wijst er op dat de DNA extractie goed verlopen is en dat er geen inhiberende factoren voor PCR in de DNA-extracten van deze drie stalen aanwezig zijn.

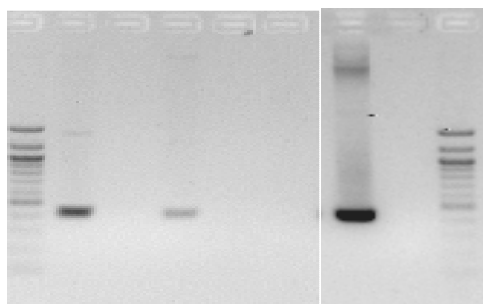
Tabel 1: overzicht van de PCR-resultaten.

Staalbenaming op agarose gel		Algemene Eubacteriële primer	Specifieke primer Dehalo ^{**}	Specifieke catabolische primers coderend voor	
				<i>vcrA</i> ⁺	<i>bvcA</i> ⁺
1	Pb 1-4	+	+	+	-
2	Pb 2-3	+	-	-	-
3	Pb 7-1	+	+	+	+/-
4	Pb 13-2	+	-	-	-
5	Pb 13-3	+	-	-	-
+	Positieve controle	+	+	+	+
bl	Blanco	-	-	-	-

^{**}Dehalo: 16S rRNA gen van *Dehalococcoides* (Löffler et al., 2000); ⁺ zie figuur 1.

Detectie van het 16S rRNA gen *Dehalococcoides* sp. (Löffler et al., 2000):

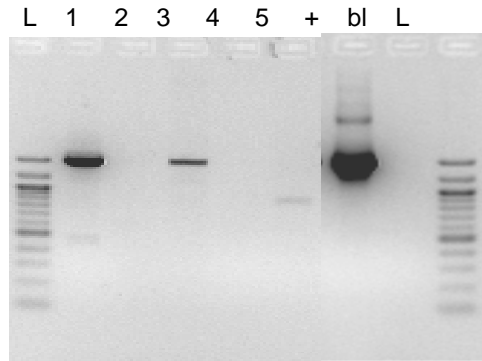
L 1 2 3 4 5 + bl L



16S rRNA gen
Dehalococcoides

Naam stalen: zie Tabel 1; L = ladder

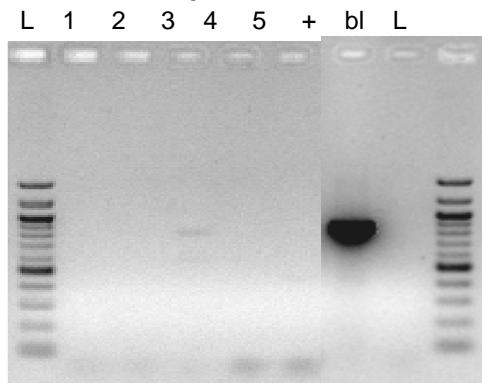
vcrA catabolisch gen:



→ *vcrA* gen
Dehalococcoides VS

Naam stalen: zie Tabel 1; L = ladder

bvcA catabolisch gen:



→ *bvcA* gen
Dehalococcoides BAV1

Naam stalen: zie Tabel 1; L = ladder

Figuur 2: PCR-resultaten op agarose gel voor de specifieke primers die het 16S rRNA van *Dehalococcoides* of de catabolische genen *vcrA* en *bvcA* detecteren.

Besluit:

Via PCR-detectie konden *Dehalococcoides* species gedetecteerd worden in twee van de vijf aangeleverde grondwaters. De positieve signalen zijn een indicatie voor de aanwezigheid van CAH-afbrekers in het grondwater bekomen van de posities pb 1-4 en pb 7-1. Blijkbaar zijn deze dehalogenerende bacteriën niet aanwezig in de grondwaters bekomen van de posities Pb 2-3, 13-2 en 13-3.

In het DNA bekomen van beide stalen Pb 1-4 en 7-1 kon ook duidelijk de aanwezigheid van het catabolische gen *vcrA* aangetoond worden. Dit wijst er op dat de stam *Dehalococcoides* VS aanwezig is in dit grondwater en dat deze de omzetting van DCE tot etheen kan bewerkstelligen.

In het DNA extract van het staal Pb 1-7 werd bovendien een licht positief PCR signaal voor het *bvcA* gen waargenomen. Dit kan er op wijzen dat er naast de *Dehalococcoides* VS populatie ook een *Dehalococcoides* BAV1 populatie aanwezig is die VC kan omzetten tot etheen.

Het is belangrijk op te merken dat een negatief PCR-sigitaal betekent dat het gen niet of in onvoldoende hoeveelheden aanwezig is in het DNA-extract, en dus het grondwaterstaal. Verder geeft een positief PCR-sigitaal aan dat het gen aanwezig is, maar niet dat het actief is. In stalen Pb 1-4 en 7-1 zijn dus de juiste bacteriën aanwezig om de omzetting van DCE naar etheen uit te voeren. Indien er echter niet voldoende koolstofbron aanwezig is in het grondwater, zal er geen afbraak optreden.

Om na te gaan of de CAHs volledig worden afgebroken tot onschadelijke producten zoals etheen en ethaan onder sitespecifieke omstandigheden kan men een microcosm-afbraaktest uitvoeren met grondwater en aquifer materiaal van de locatie.