

**Effecten van warmte- en  
koudeopslag (WKO) op fysisch-  
chemische omstandigheden en  
micro-organismen in grondwater**

Jan Gerritse  
Fredericke Hannes  
Niels van Oostrom  
Nanne Hoekstra  
Roelof Stuurman

**Projectnummer**  
092.81222

**Titel**

Effecten van warmte- en koudeopslag (WKO) op fysisch-chemische omstandigheden en micro-organismen in grondwater

**Opdrachtgever**

Ministerie van Vrom

**Kenmerk**

1004-0008

**Pagina's**

30

**Trefwoorden**

Warmte-koudeopslag (WKO)

Bacteriën

Archea

**Samenvatting**

Warmte- en koudeopslag in de bodem (WKO) wordt in Nederland steeds meer toegepast. Inzicht in de effecten van WKO op de chemische en (micro)biologische kwaliteit van grondwater is echter nog zeer beperkt. Het doel van dit verkennende onderzoek was om mogelijke effecten van WKO op de fysische, chemische en microbiologische grondwatersamenstelling aan te tonen. In dit project is grondwater onderzocht van 3 verschillende locaties waar WKO wordt toegepast: Lelystad, Utrecht-Uithof en Utrecht-Jaarbeurs. Er is geanalyseerd in het voorjaar en het najaar. Grondwater is bemonsterd uit warmtebronnen, koudebronnen en referentiepeilbuizen. Fysische parameters zijn ter plekke geanalyseerd en de chemische en microbiologische samenstelling in het laboratorium. Voor de microbiologische analyses zijn, naast klassieke kweekmethoden, moleculaire technieken gebruikt waarmee DNA, dat kenmerkend is voor verschillende functionele micro-organismen, is gekwantificeerd.

De verschillen in temperatuur tussen de warme en koude bronnen op de drie onderzochte liepen uiteen van 2 tot 5 graden Celsius. Bij de WKO's in Utrecht zijn geen grote variaties waargenomen in de fysische en chemische samenstelling van grondwater uit de warmtebronnen, koudebronnen en referentiepeilbuizen, op een overeenkomstige diepte. Dit wijst er op dat deze WKO's de grondwaterchemie nauwelijks beïnvloeden. Bij WKO Lelystad was de geleidbaarheid hoger dan bij de WKO's Utrecht en is een sterke toename van de geleidbaarheid tussen november 2008 en mei 2009 vastgesteld. Dit komt overeen met verhoogde concentraties ionen in het grondwater.

De analyses van de kweekbare bacteriën laten uiteenlopende resultaten zien en geven geen goed beeld van de aantallen en de verschillende groepen microbiële populaties in het grondwater. Met de moleculaire methode "real time PCR" zijn specifieke genen (DNA) van verschillende groepen micro-organismen in de grondwatermonsters gekwantificeerd. Hiermee is een goed beeld verkregen van de aantallen en de diversiteit van microbiële populaties bij de WKO's. Uit deze analyses blijkt dat de bacterieconcentraties varieerden van enkele honderden tot meer dan een miljoen per ml grondwater. Op een uitzondering na waren de aantallen Archea lager dan die van bacteriën. Bij de WKO's blijken nog veel niet geïdentificeerde Archea soorten aanwezig zijn, waarvan de functies in het grondwatersysteem nog onbekend zijn. Dechlorerende bacteriën (*Dehalococcoides* soorten) zijn alleen in lage concentraties gevonden bij WKO Utrecht-Jaarbeurs, waar ook vinylchloride is aangetroffen. De andere functionele bacteriegroepen, nitraat-reduceerders, ijzer-reduceerders en sulfaat-reduceerders, zijn bij alle bij de WKO's aangetoond. De diversiteit van micro-organismen bij WKO Lelystad en Utrecht-Uithof lijkt het grootste in de referentiepeilbuizen. Zowel in warmte bronnen (b.v. WKO Lelystad, november 2008) als in de koudebronnen (b.v. WKO Lelystad, mei 2009) zijn soms zeer weinig micro-organismen aangetroffen. Deze waarnemingen kunnen mogelijk verklaard worden door activiteiten bij de WKO's, zoals het regenereren van infiltratie- en onttrekkingsputten.

**Titel**

Effecten van warmte- en koudeopslag (WKO) op fysisch-chemische omstandigheden en micro-organismen in grondwater

**Opdrachtgever**  
Ministerie van Vrom

**Kenmerk**  
1004-0008

**Pagina's**  
30

In dit onderzoek zijn aanwijzingen gevonden dat WKO's de samenstelling van het grondwater kunnen beïnvloeden, maar een verbreding naar andere WKO's is nodig om een statistisch verantwoorde analyse te kunnen maken van de mogelijke effecten op de geochemische en microbiologische kwaliteit van het grondwater.

Versie	Datum	Auteur	Paraaf	Review	Paraaf	Goedkeuring	Paraaf
	apr. 2010	Jan Gerritse		Roelof Stuurman	RS	Hans Gehrels	HG
		Fredericke Hannes					
		Niels van Oostrom					
		Nanne Hoekstra					

**Status**  
definitief

## Inhoud

<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Aanpak van het onderzoek</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Materialen en methoden</b>	<b>4</b>
3.1	Grondwaterbemonstering	4
3.2	Analyse van chemische parameters	4
3.3	Analyse van micro-organismen	4
<b>4</b>	<b>Resultaten</b>	<b>9</b>
4.1	WKO Lelystad	9
4.2	WKO Utrecht - Uithof	15
4.3	Utrecht - Jaarbeurs	20
<b>5</b>	<b>Conclusies en discussie</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Literatuur</b>	<b>24</b>
	<b>Bijlage(n)</b>	
<b>A</b>	<b>Real-time PCR condities</b>	<b>A-1</b>
<b>B</b>	<b>Jaarbeurs</b>	<b>B-1</b>
<b>C</b>	<b>Analyserapport Bioclear</b>	<b>C-1</b>

## 1 Inleiding

Warmte- en koudeopslag in de bodem (WKO) wordt in Nederland steeds meer toegepast, vooral in de industriële en stedelijke omgeving. De verwachting is dat door WKO in Nederland maximaal enkele procenten van het energieverbruik en de CO<sub>2</sub>-productie kan worden verminderd. Het inzicht in de effecten van WKO op de chemische en (micro)biologische kwaliteit van grondwatersystemen is echter nog zeer beperkt. Kennis hiervan is belangrijk, bijvoorbeeld omdat het grondwater in Nederland een belangrijke bron van drink- en proceswater is. Grondwatersystemen fungeren als biologische filters voor afbraak van natuurlijke stoffen en chemische verontreinigingen. Deze natuurlijke mineralisatieprocessen worden uitgevoerd door micro-organismen, die in een “gezond” bodemsysteem de elementencycli en de kwaliteit van het grondwater waarborgen. Het specifieke functionele bodemleven zorgt er voor dat de ondergrond haar veerkracht behoudt. Hierdoor kan ze ook op lange termijn unieke ecosysteemdiensten blijven leveren. Het bevorderen en in stand houden van de filterende, doorlatende en beschermende functie van de ondergrond is dus essentieel voor een adequaat beheer van het zelfreinigende en bufferende vermogen van de bodem.

In bodem- en grondwatersystemen zijn micro-organismen verantwoordelijk voor diverse processen, zoals de minerale kringlopen, de afbraak van organische verontreinigingen, en de productie en consumptie van methaan en CO<sub>2</sub>. Hierbij schimmels (Fungi), bacteriën (Eubacteria) en Archea de meest belangrijke groepen micro-organismen, die er voor zorgen dat de bodemecosystemen duurzaam kunnen functioneren. De diversiteit van de microbiële populaties in de bodem is bijzonder groot. Iedere gram grond kan een miljard micro-organismen bevatten, verdeeld over tienduizend verschillende soorten. In de ondiepe bodem waar nog zuurstof aanwezig is, zijn naast bacteriën en archea ook schimmels actief. In de Nederlandse ondergrond (>2 m –mv) is voornamelijk sprake van anoxische (zuurstofloze) omstandigheden, waaronder fermenterende, denitrificerende, ijzer-reducerende, sulfaat-reducerende, methaan-vormende en reductief dechlorerende micro-organismen kunnen functioneren. De fysisch/chemische samenstelling van het grondwater bepaalt in principe welke van deze functionele groepen micro-organismen actief kunnen zijn. Op hun beurt beïnvloeden de micro-organismen de samenstelling van het grondwater. Door de aanwezigheid en/of de veranderingen in de functionele groepen micro-organismen te monitoren, kunnen we de complexe wisselwerking tussen biogeochemische processen in de bodem en het grondwater beter begrijpen, volgen en voorspellen. Het kwantificeren van de functionele bacteriesoorten geeft bijvoorbeeld een indicatie van de capaciteit voor natuurlijke afbraak (“natural attenuation”) van verontreinigingen, zoals organo-chloorverbindingen en koolwaterstoffen, in het bodemsysteem.

De potentiële effecten van WKO op de chemie en de ecologie van grondwatersystemen zijn in essentie onbekend. Bij verschillende temperaturen kunnen verschillende soorten micro-organismen actief zijn. Matige opwarming van de ondergrond kan wellicht leiden tot verhoogde activiteit en aantallen van de lokale microbiële populaties, terwijl afkoeling een omgekeerd effect zou kunnen hebben. Mogelijk leidt een matige opwarming van de bodem tot een toename van pathogene micro-organismen, bijvoorbeeld afkomstig uit fecale besmetting uit lekkende rioleringen. Sterke opwarming van de bodem (>40°C) kan wellicht juist leiden tot een inactiveren of afsterven van micro-organismen. Ook het in de bodem brengen van mogelijk giftige constructiematerialen (b.v. koper) en regeneratievloeistoffen

(b.v. sterke zuren) zal de biodiversiteit vermoedelijk verarmen. Een veranderd stromingspatroon van het grondwater kan eveneens van invloed zijn op ecologische en chemische evenwichten, bijvoorbeeld door het “oplossen” van organische stof en mineralen uit bodemdeeltjes, of verspreiding van verontreinigende stoffen. Vooralsnog zijn deze hypothesen van mogelijke effecten echter zeer speculatief. Er zal eerst meer en beter in het veld gemeten moeten worden om vast te kunnen stellen of de chemie en de biodiversiteit in de ondergrond door WKO daadwerkelijk verandert en in welke mate dit van invloed kan zijn voor de natuurlijke filterende functies van het bodemsysteem.

Het doel van het huidige verkennende onderzoek was om mogelijke effecten van WKO op de fysische en chemische omstandigheden en de samenstelling van microbiële populaties in het diepere grondwater aan te tonen. Dit betreft een deelonderzoek binnen het project “Effecten van warmte- en koudeopslag op de grondwaterstroming en –kwaliteit”.

## 2 Aanpak van het onderzoek

In dit project is grondwater onderzocht van 3 verschillende locaties waar WKO wordt toegepast: Lelystad, Utrecht-Uithof en Utrecht-Jaarbeurs. Er zijn analyseronden uitgevoerd in het najaar van 2008 en het voorjaar van 2009. Grondwater uit warmtebronnen, koudebronnen en uit referentiepeilbuizen is bemonsterd. Fysische parameters zijn ter plekke geanalyseerd en de chemische en microbiologische samenstelling in het laboratorium. Voor de microbiologische analyses zijn, naast klassieke kweekmethoden, moleculaire technieken gebruikt waarmee DNA, dat kenmerkend is voor verschillende functionele micro-organismen, is gekwantificeerd.

Gemeten zijn:

- Fysische parameters in het opgepompte grondwater in het veld (temperatuur, pH, redoxpotentiaal, geleidbaarheid),
- Chemische parameters (anionen, kationen en opgelost organisch koolstof),
- Kweekbare bacteriën (aeroben, anaeroben, coliformen, *E. coli*),
- Functionele groepen micro-organismen (kwantitatieve PCR)
  - Totaal Eubacteriën,
  - Totaal Archea,
  - Sulfaat-reducerende bacteriën,
  - IJzer-reducerende bacteriën,
  - Denitrificerende bacteriën,
  - Dechlorerende bacteriën,
  - Methanogene archea.

## 3 Materialen en methoden

### 3.1 Grondwaterbemonstering

Grondwaterbemonstering is uitgevoerd volgens "TNO sampling protocol: chlorinated organic compounds (VOCL) in groundwater", versie 22 juli 2008. Grondwater is bemonsterd met behulp van peristaltische slangpompen. Er is minstens 3 peilbuis volumes verpompt (30 tot 6800 liter, afhankelijk van peilbuis diepte en volume) voordat duplo grondwatermonsters zijn genomen in volledig afgevlude steriele glazen flessen (volume 1 liter). De grondwatermonsters zijn in een koelbox met ijs geplaatst voor transport naar het laboratorium.

Met op locatie gekalibreerde elektrodes zijn in een doorstroomcel de temperatuur, pH, geleidbaarheid en redoxpotentiaal bepaald.

### 3.2 Analyse van chemische parameters

Voor de analyse van anionen en kationen in het grondwater zijn twee methoden gebruikt:

- Dionex ion chromatografie. Anionen (chloride, bromide, nitriet, nitraat, fosfaat en sulfaat) zijn bepaald volgens "TNO Werkvoorschrift: De bepaling van anionen met behulp van ionchromatografische analyse, versie 3, 11 november 2008. Kationen (natrium, ammonium, kalium, magnesium en calcium) zijn bepaald volgens "TNO Werkvoorschrift: De bepaling van kationen met behulp van ionchromatografische analyse, versie 3, 11 november 2008.
- ICP/OES analyses zijn uitgevoerd volgens werkvoorschrift GL-WV 014 voor het bepalen van aluminium, boor, barium, calcium, chloor, kobalt, chroom, ijzer, kalium, lithium, magnesium, mangaan, natrium, nikkel, fosfor, zwavel, scandium, silicium, strontium, titaan, vanadium, yttrium en zink in grondwater.

Voor de gemeenschappelijk gedetecteerde ionen, gaven de dionex en ICP/OIS methoden in essentie dezelfde resultaten.

Opgelost organisch koolstof (DOC) is bepaald op een Shimadzu TOC analyser, volgens werkvoorschrift GL-WV 017.

### 3.3 Analyse van micro-organismen

#### *Klassieke kweekmethoden*

Kweekbare bacteriën (kolonie vormende eenheden) zijn bepaald door verdunningen van grondwater uit te platen op agar media. De verdunningen in de range van 10 tot 10<sup>9</sup>-voud zijn gemaakt in een steriele bufferoplossing.

Heterotrofe bacteriën zijn geteld op R<sub>2</sub>A agar platen (Difco) die bij 30°C zijn geïncubeerd onder, respectievelijk, lucht of een anaerobe atmosfeer. Heterotrofe bacteriën zijn micro-organismen die organische stoffen gebruiken als bron voor groei en energie. Het R<sub>2</sub>A agar medium bevat veel verschillende organische stoffen en is speciaal ontworpen om er zo veel mogelijk bacteriën op te laten groeien. Voor anaerobe tellingen zijn de verdunningen gemaakt in een anaerobe kast (Coy Laboratory Products). Voor het incuberen van de anaerobe agar platen bij 30°C is gebruik gemaakt van anaerobe potten met het "anaerocult" systeem (Merck).



Coliforme bacteriën zijn indicatoren van fecale besmetting van grondwater. Deze bacteriën zijn geteld op chromogene agarplaten (Difco). Op deze platen zijn coliformen zichtbaar als roze/paarse kolonies.

#### *Moleculaire detectie*

Van de micro-organismen die in water, bodem en sediment voorkomen is meestal minder dan één procent levensvatbaar in gebruikelijke kweekmedia. Bovendien is het kweken van micro-organismen een arbeidsintensief en tijdrovend proces. Daarom is in dit project de moleculaire methode “real time PCR” gebruikt voor het kwantificeren van verschillende groepen micro-organismen in grondwater. Kwantitatieve real time PCR is gericht op het aantonen van specifieke genetische informatie (DNA) van micro-organismen en hun enzymen. Het DNA van micro-organismen bevat soortspecifieke en enzymspecifieke genen die gebruikt kunnen worden als “bioindicator”. Door deze genen aan te tonen kan de aanwezigheid van bepaalde organismen en/of enzymen in een bodem- of grondwatermonster worden vastgesteld. Voor bacteriesoortherkenning worden meestal ribosomale 16S rRNA genen gebruikt als target. Ribosomen zijn moleculaire “eiwit fabriekjes” die in alle levende cellen aanwezig zijn. Momenteel is het DNA van meer dan 200.000 microbiële 16S rRNA genen bekend en beschikbaar in databanken (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Elke Archea of bacterie bezit 1 tot 10 kopieën van het 16S rDNA gen per cel. De genen van specifieke enzymen kunnen worden gebruikt als target voor het aantonen van verschillende functionele groepen micro-organismen, bijvoorbeeld methanogene archea of sulfaat-reducerende, denitrificerende of dechlorerende bacteriën.

Real-time PCR is een snelle methode waarbij met specifieke DNA primers en probes de verschillende micro-organismen kunnen worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Hierbij wordt in een reactievatje een specifiek deel van het DNA van de verschillende bioindicatorgenen vermenigvuldigd door het enzym “Taq-polymerase” (PCR = “polymerase chain reaction”). Het vermenigvuldigde DNA wordt door middel van fluorescentie gedetecteerd en gekwantificeerd aan de hand van een kalibratielijn met bekende concentraties van het te detecteren DNA. Er zijn twee variaties op deze methode: de één maakt gebruik van een fluorescente kleurstof die in het gevormde dubbelstrengs-DNA geïncorporeerd wordt, de ander maakt gebruik van een gemodificeerd oligonucleotide van DNA (‘de probe’). Wanneer deze probe hybridiseert met complementaire target-DNA ontstaat een fluorescentie die wordt gedetecteerd. Wij hebben beide methoden gebruikt. Om de PCR-reactie geschikt te maken voor bepaalde indicatoren hebben we specifieke “primers” gebruikt (tabel 1).

Voor detectie via real time PCR zijn de micro-organismen eerst uit 150 ml grondwater geconcentreerd op 0.2 µm membraan filters (Millipore). Het totaal microbiële DNA is vervolgens geïsoleerd in duplo m.b.v. de Fast DNAspin kit (for soil) (Q BIOgene, Cambridge, United Kingdom). Dit DNA is bij -20°C bewaard, voor analyse door middel van real time PCR.

#### *Selectie van functionele groepen micro-organismen*

In deze studie is gefocust op bacteriën (ook bekend als “Eubacteria”) én op Archaea (ook bekend als “oerbacteriën”). Dit zijn de belangrijkste groepen micro-organismen in diepere grondwatersystemen. Zowel bacteriën als Archaea zijn microscopisch kleine, eencellige organismen zonder celkern, zogenaamde prokaryoten. Ze hebben een chromosoom (DNA) waarin de genetische informatie is opgeslagen. Specifieke stukken van dit DNA kunnen worden gebruikt om verschillende soorten en groepen bacteriën en Archaea aan te tonen. Bacteriën komen overal voor en vervullen verschillende nuttige functies in het ecosysteem. De Archaea hebben eigenschappen die afwijken van bacteriën. Ze lijken genetisch gezien

soms meer op organismen met celkern. Archaea kunnen vaak onder extreme omstandigheden leven, maar ook gewoon in moerasland, rioolwater en de bodem. Een aantal soorten Archaea kan methaan produceren. Deze worden de methanogenen of methanogene Archaea genoemd.

Functionele micro-organismen in deze studie aangetoond met kwantitatieve real time PCR:

- **Totaal Bacteriën** zijn aangetoond door detectie van de totaal 16S rDNA genen van deze micro-organismen.
- **Totaal Archea** zijn aangetoond door detectie van de totaal 16S rDNA genen van deze micro-organismen.
- **Denitrificerende bacteriën** zijn aangetoond door detectie van het gen van het enzym nitraat-reductase (NAR-gen). Dit enzym is verantwoordelijk voor de reductie van nitraat tot nitriet. De denitrificerende bacteriën zijn essentieel in de stikstofcyclus, want ze kunnen nitraat als elektronenacceptor gebruiken en omzetten in stikstofgas (N<sub>2</sub>). Dit anaerobe ademhalingsproces vindt vooral plaats in een zuurstofloze omgeving. De denitrificatie tot stikstof gaat via enkele stappen: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NO → N<sub>2</sub>O → N<sub>2</sub>. Elke reactiestap wordt door een specifiek enzym gekatalyseerd.
- **Ijzer-reducerende bacteriën** zijn aangetoond door detectie van 16S rDNA genen van *Geobacter*. *Geobacter* is een anaërobe bacteriesoort die kan ademen door geoxideerde ijzermineralen te reduceren. Dit micro-organisme is nuttig voor het reinigende vermogen van bodemsystemen, want *Geobacter* kan een breed spectrum organische stoffen, waaronder aardoliecomponenten mineraliseren. Er zijn ook andere ijzer-reducerende bacteriën en archea bekend, maar ze zijn genetisch en fysiologisch zo verschillend van elkaar, dat het niet mogelijk is om deze met een of enkele assays te detecteren. Geobactersoorten zijn numeriek de meest gevonden ijzer-reducerende micro-organismen in sedimenten en bodemsystemen. Daarom is het 16S rDNA van deze bacteriegroep geselecteerd als indicator voor ijzer-reducerende bacteriën.
- **Sulfaat-reducerende bacteriën** (SRB) zijn aangetoond door detectie van het gen van het enzym sulfiet-reductase (DsrA gen). Dit enzym is verantwoordelijk voor de reductie van sulfiet. De SRB gebruiken sulfaat als elektronenacceptor voor hun ademhaling door het (via sulfiet) te reduceren tot sulfide (H<sub>2</sub>S). De meeste SRB kunnen ook andere geoxideerde zwavelverbindingen, zoals sulfiet, thiosulfaat, of elementair zwavel, gebruiken. De geur van rotte eieren, afkomstig van waterstofsulfide, is vaak een indicatie voor de activiteit van SRB in grond. Het enzym sulfiet-reductase is essentieel voor het sulfaat-reductieproces en geselecteerd als indicator voor sulfaat-reducerende bacteriën.
- **Dechlorerende bacteriën** zijn aangetoond door detectie van 16S rDNA genen van *Dehalococcoides*. De dechlorerende bacteriën, kunnen toxische chloorverbindingen omzetten tot minder schadelijke of onschadelijke verbindingen. Alle bekende *Dehalococcoides* soorten hebben deze eigenschap. *Dehalococcoides* komt veel voor in bodemsystemen. Zij worden daarom vaak ingezet bij biologische sanering van met tetrachloroethen (PCE) en trichloroethen (TCE) verontreinigde locaties. Daarbij wordt PCE via TCE, 1,2-dichloroethen en vinylchloride omgezet in etheen. *Dehalococcoides* bacteriën kunnen echter ook andere veel voorkomende chloorverbindingen dehalogenen, zoals, 1,2-dichloorethaan, PCBs, chloorbenzenen, chloornafthalenen, chloordibenzoedioxines en chloordibenzoefuranen. Daarom is het 16S rRNA gen van de bacteriesoort *Dehalococcoides* geselecteerd als indicator voor dechlorerende bacteriën.
- **Methanogene Archea** zijn aangetoond door detectie van het gen van het enzym methyl-CoM reductase (mcrA gen). Dit enzym is verantwoordelijk voor de productie van

methaan. Methanogenen zijn anaërobe Archaea die in een zuurstofloze omgeving methaan produceren uit m.n. waterstof plus CO<sub>2</sub> of uit acetaat. Methanogenen leven in synergie met anaerobe bacteriën die complex organisch materiaal hydrolyseren en fermenteren, waarbij het waterstof en acetaat geproduceerd worden. Door het wegvangen van deze eindproducten zorgen de methanogenen voor het voltooien van het mineralisatieproces in afwezigheid van elektronenacceptoren als zuurstof, nitraat, ijzer of sulfaat. Ze komen veel voor in systemen met beperkte beschikbaarheid van elektronenacceptoren, bijvoorbeeld, grondwatersystemen, stortplaatsen, moerassen, rijstvelden, de pens van herkauwers en in insecten. Methanogenen leveren een belangrijke bijdrage aan de productie van broeikasgassen op aarde.

Tabel 1. Primersequenties voor specifieke detectie van de verschillende groepen micro-organismen

<b>Micro-organisme</b>	<b>Target</b>	<b>Primers</b>
Totaal aantal bacteriën	Eubacterieel 16S rDNA	<b>519F</b> 5'-GCC AGC AGC CGC GGT AAT-3' <b>907R</b> 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'
Totaal aantal archaea	Archae 16S rDNA	<b>Arch0025F</b> 5'-CTG GTT GAT CCT GCC AG-3' <b>364R</b> 5'-TCG CGC CTG CTG CGC CCC GT-3'
Dechlorerende bacteriën	<i>Dehalococcoides</i> 16S rDNA	<b>Dhc1200F</b> 5'-CTG GAG CTA ATC CCC AAA GCT-3' <b>Dhc1271R</b> 5'-CAA CTT CAT GCA GGC GGG-3' <b>Dhc1240Probe</b> 5'-TCC TCA GTT CGG ATT GCA GGC TGAA-3'
Denitrificerende bacteriën	Nitraat-reductase (NAR-gen)	<b>NARG F</b> 5'-TCG CC(C/G) AT(C/T) CCG GC(C/G) ATG TC-3' <b>NARG R</b> 5'-GAG TTG TAC CAG TC(A/G)GC(C/G)GA(C/T) TC(C/G) G-3'
<i>Geobacter</i>	<i>Geobacteriales</i> 16S rDNA	<b>GEO564F</b> 5'-AAG CGT TGT TCG GAW TTA T-3' <b>GEO840R</b> 5'-GGC ACT GCA GGG GTC AAT A-3'
Sulfaat-reducerende bacteriën (SRB)	Sulfiet-reductase (DsrA gen)	<b>DsrA1F</b> 5'-ACS CAC TGG AAG CAC G-3' <b>DsrA500R</b> 5'-CGG TGM AGY TCR TCC TG-3'
Methanogene archaea	Methyl-CoM reductase (mcrA gen)	<b>ME1F</b> 5'-GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC-3' <b>ME3R</b> 5'-TGT GTG AAS CCK ACD CCA CC-3'

## 4 Resultaten

### 4.1 WKO Lelystad

#### *Fysische parameters*

Het grondwater van WKO Lelystad is bemonsterd op 12 november 2008 en op 26 mei 2009. De bemonsterde peilbuizen bevonden zich op een diepte variërend van ongeveer 16 tot 88 meter beneden maaiveld (Tabel 2). Het temperatuursverschil tussen het “koude” en “warme” grondwater was 3,5°C in november 2008 en 5,4°C in mei 2009. Het grondwater was neutraal tot licht zuur, met mild reducerende condities. De geleidbaarheid was lager in de ondiepere peilbuizen. In mei 2009 was de geleidbaarheid in alle peilbuizen hoger dan in november 2008.

Tabel 2. Fysische parameters grondwater WKO Lelystad

Peilbuis	Diepte (m -mv)	Temperatuur (°C)		pH		Geleidbaarheid (µS/cm)		Redox potentiaal (mV)	
		Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009
Koud 1	20,90	10,6	*	6,60	*	1510	*	-52	*
Koud 2	82,50	10,3	9,2	6,95	6,86	3980	11000	-76	-62
Warm 1	18,80	13,9	14,5	6,28	6,48	1760	2800	-73	-85
Warm 2	88,20	14,0	14,6	6,79	6,86	5040	10800	-72	-90
Referentie 1	15,95	12,4	12,7	6,47	6,46	1500	2690	-56	-80
Referentie 2	51,40	12,2	12,3	6,77	6,77	3310	6950	-81	-85
Referentie 3	82,60	12,2	12,2	6,95	6,95	4500	10800	-64	-67

\* Bemonstering peilbuis “Koud 1” was niet mogelijk in mei 2009

#### *Chemische parameters*

Uit de Dionex analyse blijkt dat bij Lelystad in het grondwater in de diepere peilbuizen hogere anionen en kationen concentraties aanwezig zijn dan in de ondiepe peilbuizen (Tabel 3). Vooral in mei 2009 zijn hoge chloride concentraties (>3,5 g/L) aangetroffen. Dit is in overeenstemming met de hogere geleidbaarheid die in deze peilbuizen is waargenomen (Tabel 2). Opvallend zijn de relatief hoge ammonium concentraties.

Uit de ICP-OES elementenanalyse blijkt dat bij Lelystad in het grondwater in principe voldoende nutriënten voor groei van micro-organismen aanwezig zijn (Tabel 4). De ijzeranalyses wijzen op de activiteit van ijzer-reducerende bacteriën in mei 2009, vooral in het ondieper grondwater (16-21 m -mv). De analyses duiden niet op verhoogde concentraties toxische elementen (b.v. nikkel, koper, zink) ten gevolge van WKO-activiteiten.

In mei 2009 zijn ook de opgeloste organisch koolstof concentraties (DOC) gemeten. Er waren geen grote verschillen in het DOC in het grondwater van de verschillende warmte- en koudebronnen en de referentiepeilbuizen. Het DOC-gehalte was in de range van 12 tot 17 mg C/l.

Tabel 3. Dionex ion analyse van anionen en kationen in grondwater van WKO Lelystad (concentraties in mg/l)

		Chloride		Bromide		Sulfaat		Natrium		Ammonium		Kalium		Magnesium		Calcium	
Peilbuis	Diepte (m -mv)	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009
Koud 1	20,90	786	*	2,7	*	<1	*	282	**	57	**	14	**	69	**	278	**
Koud 2	82,50	718	3765	10,3	11,8	14,0	15,4	1474	**	309	**	57	**	243	**	248	**
Warm 1	18,80	633	683	2,3	2,9	<1	<1	209	**	42	**	12	**	60	**	255	**
Warm 2	88,20	720	3485	10,4	11,5	14,0	15,3	1479	**	310	**	51	**	225	**	275	**
Referentie 1	15,95	631	661	2,2	2,9	<1	<1	199	**	63	**	13	**	65	**	245	**
Referentie 2	51,40	**	2195	5,7	7,2	<1	<1	950	**	213	**	48	**	161	**	190	**
Referentie 3	82,60	**	3635	10,6	11,7	0,9	1,2	1467	**	308	**	57	**	251	**	253	**

Nitraat, nitriet, fosfaat <1 mg/l

\* Bemonstering peilbuis "Koud 1" was niet mogelijk in mei 2009

\*\* Niet gemeten

Tabel 4. ICP-OES elementenanalyse van anionen en kationen in grondwater van WKO Lelystad (concentraties in mg/l)

		Boor		Barium		IJzer		Kalium		Magnesium		Mangaan		Fosfor		Zwavel		Silicium		Strontium	
Peilbuis	Diepte (m - mv)	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009	Nov. 2008	Mei 2009
Koud 1	20,90	0,2	*	0,3	*	**	*	18	*	67	*	2,0	*	<0,1	*	0,4	*	15	*	1,0	*
Koud 2	82,50	0,7	0,7	0,6	0,8	**	6,6	>50	>50	>200	227	0,2	0,3	0,2	1,0	4,8	5,4	9	9,4	1,7	1,8
Warm 1	18,80	0,2	0,3	0,3	0,7	**	31	17	17	63	63	2,5	3,7	<0,1	2,0	0,4	0,5	17	20	0,9	1,0
Warm 2	88,20	0,6	0,7	0,6	0,9	**	6,6	>50	>50	>200	>230	0,3	0,3	0,1	1,1	4,7	5,5	9	9,5	1,7	1,8
Referentie 1	15,95	0,2	0,3	1,2	0,6	**	29	16	16	61	60	2,8	3,3	0,0	1,8	0,6	0,5	16	19	0,9	1,0
Referentie 2	51,40	0,7	0,7	0,6	0,9	**	13	>50	>50	149	151	0,4	0,9	0,1	1,5	0,5	0,6	11	12	1,1	1,1
Referentie 3	82,60	0,6	0,7	0,7	0,9	**	5,4	>50	>50	>200	224	0,2	0,3	0,4	1,0	0,6	0,8	9	9,1	1,8	1,8

Aluminium, kobalt, chroom, koper, lithium, nikkel, scandium, titaan, vanadium en yttrium <0,1 mg/L; zink <0,1 mg/l behalve op mei 2009 in "Warm 1" en "Referentie 1" 0,1 mg/l

\* Bemonstering peilbuis "Koud 1" was niet mogelijk in mei 2009

\*\* Niet gemeten

*Kweekbare micro-organismen*

In november 2008 waren de concentraties aerobe en anaerobe kweekbare bacteriën in het koude grondwater van WKO Lelystad lager dan in het warme grondwater. Coliforme bacteriën zijn niet aangetoond.

Tabel 5. Kweekbare bacteriën in grondwater (kolonie vormende eenheden per ml = KVE/ml) van WKO Lelystad

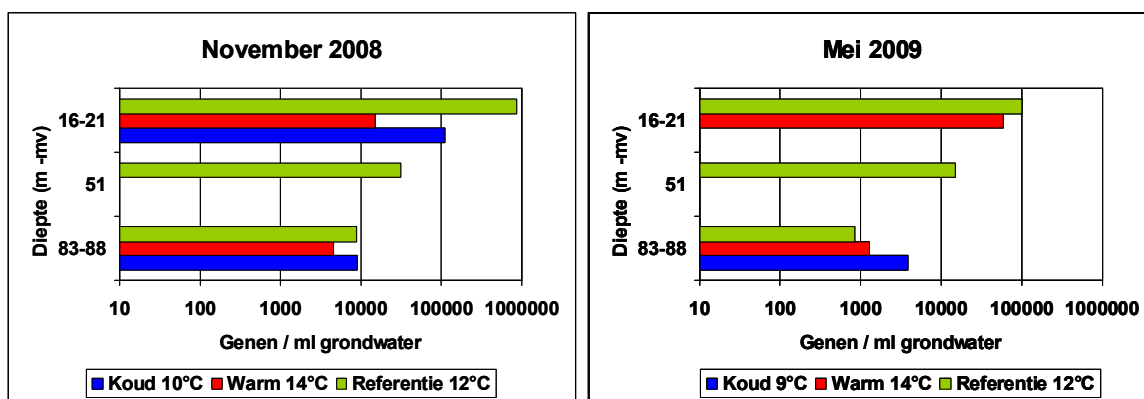
		<b>Aerobe bacteriën</b>	<b>Anaerobe bacteriën</b>	<b>Coliforme bacteriën</b>
<b>Peilbuis</b>	<b>Diepte (m -mv)</b>	<b>Nov. 2008</b>	<b>Nov. 2008</b>	<b>Nov. 2008</b>
Koud 2	82,50	0,3	<0,1	<0,1
Warm 2	88,20	3,3	0,9	<0,1

*Kwantitatieve PCR detectie van micro-organismen*

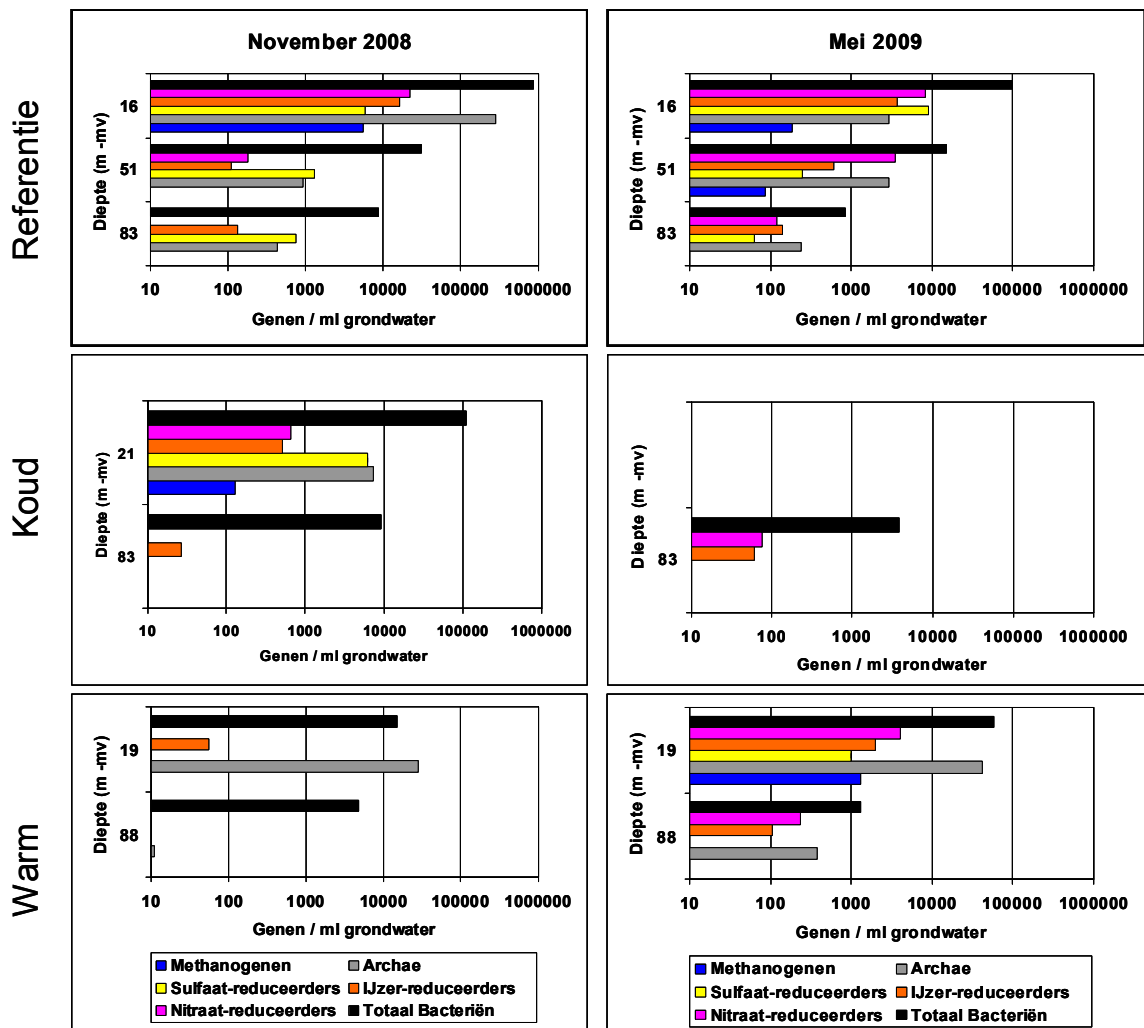
Met kwantitatieve real-time PCR (qPCR) is het totale aantal 16S rDNA genen van bacteriën in grondwatermonsters van WKO Lelystad op verschillende dieptes bepaald (Figuur 1). Iedere bacteriecel heeft 1 tot 10 kopieën van deze genen in het DNA. Uit de analyse blijkt dat het totale aantal bacteriën in de grondwatermonsters vele malen groter is dan het aantal kweekbare bacteriën (Tabel 5). De hoogste concentraties werden vastgesteld in het referentiegrondwater. De bacterieconcentraties nemen af in de diepte. In november 2008 zijn in de referentiepeilbuis per ml grondwater op 16 m –mv ca. 900.000 duizend 16S rDNA genen aangetoond, en op 83 m –mv ca. 9.000 genen. In mei 2009 waren de bacterieconcentraties in de referentiepeilbuizen lager dan in november 2008. De qPCR analyse toont aan dat de totale bacterieconcentraties in de bemonsterde peilbuizen in de warme grondwaterbron bij WKO Lelystad lager waren dan die in de koudebron.

De concentraties van verschillende functionele groepen micro-organismen in het grondwater bij WKO Lelystad zijn weergegeven in figuur 2. Opvallend is dat de hoogste diversiteit van micro-organismen, zowel in november 2008 als in mei 2009, is aangetroffen in de referentiepeilbuizen. Behalve dechlorerende bacteriën (*Dehalococcoides* 16S rDNA genen <20 per ml) zijn alle geanalyseerde groepen (totaal bacteriën, nitraat-reduceerders, ijzer-reduceerders, sulfaat-reduceerders, archaea en methanogenen) hierin gedetecteerd. Opvallend is de zeer lage diversiteit van micro-organismen in het warme grondwater in november 2008. In mei 2009 lijkt de biodiversiteit in dit grondwater in belangrijke mate hersteld. Wanneer gemiddelde specifieke genconcentraties van de verschillende groepen bacteriën worden gerelateerd aan de totaal bacterieel 16S rDNA concentraties, is tussen november 2008 en mei 2009 een toename te zien van respectievelijk, het percentage ijzer-reduceerders (van 2% naar 9%), sulfaat-reduceerders (van 1% naar 3%) en nitraat-reduceerders (van 1% naar 15%). Het gemiddelde aantal methanogene methyl-CoM-reductase genen bedroeg in november 2008 en mei 2009 ongeveer 2% van het gemiddelde aantal Archea 16S rDNA genen.





Figuur 1. Aantallen 16S rDNA genkopieën van bacteriën per ml referentie (groen), warm (rood), of koud (blauw) grondwater van WKO Lelystad in november 2008 en mei 2009



Figuur 2. Aantallen genen van verschillende functionele groepen micro-organismen per ml grondwater van WKO Lelystad in november 2008 en mei 2009

## 4.2 WKO Utrecht - Uithof

### Fysische parameters

Het grondwater in WKO Utrecht-Uithof is bemonsterd op 10 oktober 2008 en op 15 en 16 mei 2009. De bemonsterde peilbuizen bevonden zich op een diepte variërend van 38 tot 165 meter beneden maaiveld (Tabel 6). Het gemiddelde temperatuursverschil tussen het "koude" en "warme" grondwater was 2,0°C in oktober 2008 en 5,0°C in mei 2009. Het grondwater was neutraal tot licht basisch in de diepere referentiepeilbuizen. De condities waren mild reducerend, met lagere redox potentiaal in de diepere peilbuizen. In mei 2009 was de redox potentiaal lager dan in oktober 2008. De geleidbaarheid van het grondwater bij WKO Utrecht-Uithof was lager dan bij WKO Lelystad. De geleidbaarheid was lager in de diepere peilbuizen. In mei 2009 was de geleidbaarheid in alle peilbuizen hoger dan in oktober 2008.

Tabel 6. Fysische parameters grondwater WKO Utrecht - Uithof

Peilbuis	Diepte (m -mv)	Temperatuur (°C)		pH		Geleidbaarheid (µS/cm)		Redox potentiaal (mV)	
		Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009
Koud 1	47,60	12,7	9,4	6,96	7,31	555	819	-49	-83
Koud 2	48,20	12,1	8,8	7,10	7,41	474	829	-39	-80
Koud 3	43,08	12,6	9,7	6,91	6,70	630	840	-35	-40
Koud 4	38,40	13,3	9,4	6,84	7,21	557	817	-25	-88
Koud * mengmonster		13,1	8,9	7,35	7,29	509	880	-65	-78
Warm 1	50,20	14,2	14,5	6,98	6,63	539	825	-81	-98
Warm 2	47,00	14,2	14,5	7,00	7,38	553	830	-59	-96
Warm 3	40,40	**	14,1	**	7,08	**	806	**	-95
Warm 4	39,42	15,6	14,1	7,10	7,08	515	806	-85	-103
Referentie 1	40,40	14,0	13,1	6,86	7,01	469	667	-40	-110
Referentie 2	66,00	14,5	12,6	7,36	8,42	247	255	-10	-146
Referentie 3	125	14,1	12,5	7,77	8,57	240	248	-55	-123
Referentie 4	165	13,5	12,7	7,76	8,24	192	234	-67	-154
Referentie 5	130	13,8	12,8	7,69	7,87	192	246	-37	-160

\* Mengmonster van peilbuis "Koud 1+2+3+4" in oktober 2008, of van peilbuis "Koud 1+2" in mei 2009

\*\* Bemonstering peilbuis "Warm 3" was niet mogelijk in oktober 2008

### Chemische parameters

Uit de Dionex analyse blijkt dat bij WKO Utrecht-Uithof lagere concentraties ionen in het grondwater aanwezig zijn dan bij WKO Lelystad (Tabel 7). Het grondwater van Utrecht-Uithof is dus minder zout dan dat van Lelystad. Vooral in het grondwater in de diepe referentiepeilbuizen zijn lage anionen en kationen concentraties aanwezig. Er zijn geen grote verschillen in de ionenconcentraties vastgesteld tussen oktober 2008 en mei 2009. Uit de ionenanalyse blijkt verder dat de concentraties van ammonium, nitraat en nitriet laag zijn. Dit betekent dat bij WKO Utrecht-Uithof stikstof mogelijk beperkend kan zijn voor de groei van micro-organismen.

De ICP-EOS analyse laat voor de meeste elementen bij WKO Utrecht-Uithof geen grote verschillen zien tussen de grondwatermonsters in oktober 2008 en mei 2009. De concentraties van ijzer en mangaan in het grondwater dat is bemonsterd in mei 2009 duiden op de activiteit van ijzer en mangaan-reducerende bacteriën. De analyses duiden niet op verhoogde concentraties toxische elementen (b.v. nikkel, koper, zink) ten gevolge van WKO-activiteiten.

In mei 2009 zijn ook de opgeloste organisch koolstof concentraties (DOC) in het grondwater van WKO Utrecht-Uithof gemeten. Er waren geen grote verschillen in het DOC in het grondwater van de verschillende warmte- en koudebronnen en referentiepeilbuis 1 (DOC-gehalte 5,6 tot 6,6 mg C/l). Dit zijn 2 tot 3 keer lagere concentraties dan bij WKO Lelystad. In de diepere referentiepeilbuizen zijn DOC-concentraties variërend van 0,8 tot 1,1 mg/l gemeten.

Tabel 7. Dionex ion analyse van anionen en kationen in grondwater van WKO Utrecht-Uithof (concentraties in mg/l)

		Chloride		Sulfaat		Natrium		Magnesium		Calcium	
Peilbuis	Diepte (m -mv)	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009
Koud 1	47,60	95	75	66	65	59	***	12	***	133	***
Koud 2	48,20	53	80	46	64	46	***	9,1	***	136	***
Koud 3	43,08	107	76	43	63	78	***	9,2	***	128	***
Koud 4	38,40	74	79	54	63	58	***	8,8	***	123	***
Koud mengmonster *		68	80	52	65	54	***	9,1	***	127	***
Warm 1	50,20	71	81	57	64	61	***	10	***	145	***
Warm 2	47,00	67	81	59	65	60	***	10	***	139	***
Warm 3	40,40	**	80	**	64	**	***	**	***	**	***
Warm 4	39,42	73	79	55	64	65	***	9,2	***	131	***
Referentie 1	40,40	46	40	63	58	39	***	11	***	130	***
Referentie 2	66,00	11	10	8,8	6	11	***	3,0	***	37	***
Referentie 3	125	15	9	4,7	4	18	***	4,2	***	44	***
Referentie 4	165	9,5	9	1,1	2	15	***	3,2	***	41	***
Referentie 5	130	11	9	5,8	5	13	***	3,2	***	40	***

Bromide, nitraat, nitriet, fosfaat, lithium, ammonium: <1 mg/l; kalium: <2 mg/l

\* Mengmonster van peilbuis "Koud 1+2+3+4" in oktober 2008, of van peilbuis "Koud 1+2" in mei 2009

\*\* Bemonstering peilbuis "Warm 3" was niet mogelijk in oktober 2008

\*\*\* Niet gemeten

Tabel 8. ICP-OES elementenanalyse van anionen en kationen in grondwater van WKO Utrecht-Uithof (concentraties in mg/l)

Peilbuis	Diepte (m - mv)	Boor		Barium		Calcium		Chloor		IJzer		Kalium		Magnesium		Mangaan		Natrium		Fosfor		Zwavel		Silicium		Strontium		Zink	
		Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009
Koud 1	47,60	<0,1	0,03	0,1	0,2	118	129	107	77	***	14	1,9	1,7	13	11	***	0,9	55	44	<0,1	0,2	26	22	8,3	9,0	0,4	0,4	<0,1	0,05
Koud 2	48,20	<0,1	0,03	0,1	0,2	116	133	69	79	***	14	1,7	1,9	10	11	***	1,0	34	45	<0,1	0,2	18	23	9,3	9,4	0,4	0,4	<0,1	0,05
Koud 3	43,08	<0,1	0,03	0,1	0,2	102	131	130	77	***	14	2,2	1,9	10	11	***	1,0	71	44	<0,1	0,2	17	22	9,2	9,3	0,4	0,4	<0,1	0,04
Koud 4	38,40	<0,1	0,04	0,1	0,2	108	128	85	77	***	13	1,8	1,9	9,8	10	***	0,9	47	44	<0,1	0,2	21	22	9,5	9,1	0,4	0,4	<0,1	0,06
Koud * mengmonster		<0,1	0,03	0,1	0,2	107	129	83	76	***	13	1,9	1,8	10	10	***	1,0	45	44	<0,1	0,1	20	22	9,1	9,1	0,4	0,4	<0,1	0,02
Warm 1	50,20	<0,1	0,03	0,1	0,2	129	129	103	77	***	13	2,0	1,8	13	11	***	1,0	54	43	<0,1	0,2	26	22	8,3	9,1	0,4	0,4	<0,1	0,04
Warm 2	47,00	<0,1	0,03	0,1	0,2	124	127	90	77	***	13	1,9	1,9	12	11	***	0,9	46	43	<0,1	0,2	25	22	9,0	9,2	0,4	0,4	<0,1	0,06
Warm 3	40,40	**	0,03	**	0,2	**	129	**	76	**	13	**	1,8	**	11	**	1,0	**	44	**	0,2	**	22	**	9,3	**	0,4	**	0,04
Warm 4	39,42	<0,1	0,04	0,1	0,2	110	128	83	76	***	13	1,9	1,9	10	11	***	1,0	45	43	<0,1	0,2	21	22	9,2	9,2	0,4	0,4	<0,1	0,07
Referentie 1	40,40	<0,1	0,04	0,1	0,2	51	112	48	43	***	11	1,5	1,3	10	8,8	***	0,6	24	20	<0,1	0,2	21	20	9,1	8,7	0,3	0,3	<0,1	0,06
Referentie 2	66,00	<0,1	0,02	<0,1	0,2	35	37	17	13	***	0,4	0,7	0,9	3,0	3,1	***	0,1	8,0	14	<0,1	0,2	3,4	2,1	6,5	6,9	0,1	0,1	<0,1	0,03
Referentie 3	125	<0,1	0,02	0,1	0,2	43	41	24	11	***	0,2	1,0	0,7	3,9	3,3	***	0,1	16	9,5	0,1	0,1	1,9	1,5	7,5	7,1	0,1	0,1	0,1	0,05
Referentie 4	165	<0,1	0,03	<0,1	0,2	39	38	14	10	***	0,3	1,0	1,0	3,3	3,1	***	0,3	11	10	0,1	0,2	0,9	0,9	9,4	8,5	0,1	0,1	0,1	0,03
Referentie 5	130	<0,1	0,01	0,1	0,2	38	39	16	12	***	0,3	0,8	0,8	3,3	3,2	***	0,1	11	10	<0,1	0,2	2,2	1,8	7,4	6,8	0,1	0,1	<0,1	0,04

Aluminium, kobalt, chroom, koper, lithium, nikkel, scandium, titaan, vanadium en yttrium <0,1 mg/L

\* Mengmonster van peilbuis "Koud 1+2+3+4" in oktober 2008, of van peilbuis "Koud 1+2" in mei 2009

\*\* Bemonstering peilbuis "Warm 3" was niet mogelijk in oktober 2008

\*\*\* Niet gemeten

*Kweekbare micro-organismen*

In oktober 2008 waren de concentraties kweekbare bacteriën in het grondwater uit de warme bron van WKO Utrecht – Uithof ongeveer 10 keer hoger dan in de koude bron (Tabel 9). Opvallend is dat in mei 2009 juist meer kweekbare bacteriën koude bron zijn aangetoond.

Tabel 9. Kweekbare bacteriën in grondwater (kolonie vormende eenheden per ml = KVE/ml) van WKO Utrecht-Uithof

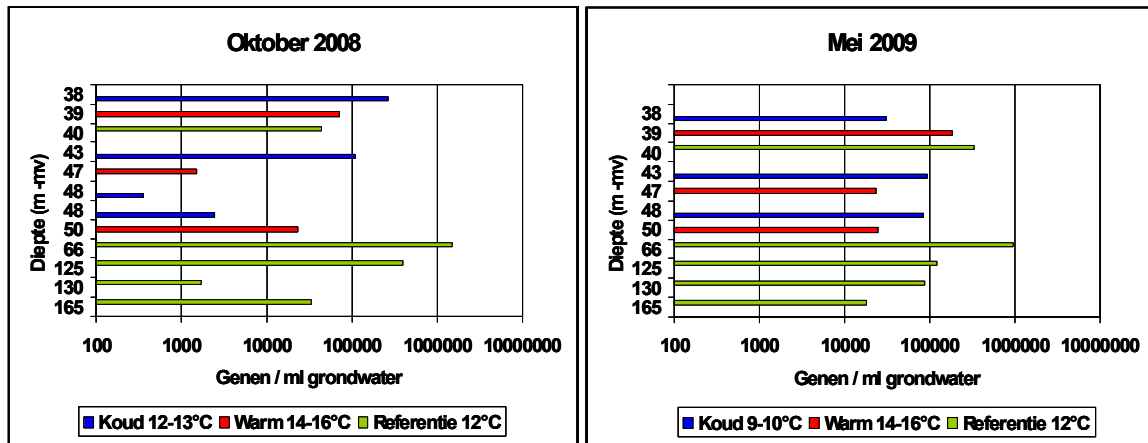
		Aerobe bacteriën		Anaerobe bacteriën		Coliforme bacteriën	
Peilbuis	Diepte (m -mv)	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009	Okt. 2008	Mei 2009
Koud 1	47,60	80	549	2,5	8,8	35	0,7
Warm 1	50,20	750	175	11	0,6	350	0,1
Referentie 1	40,40	*	36	*	0,5	*	0,9

\* Niet gemeten

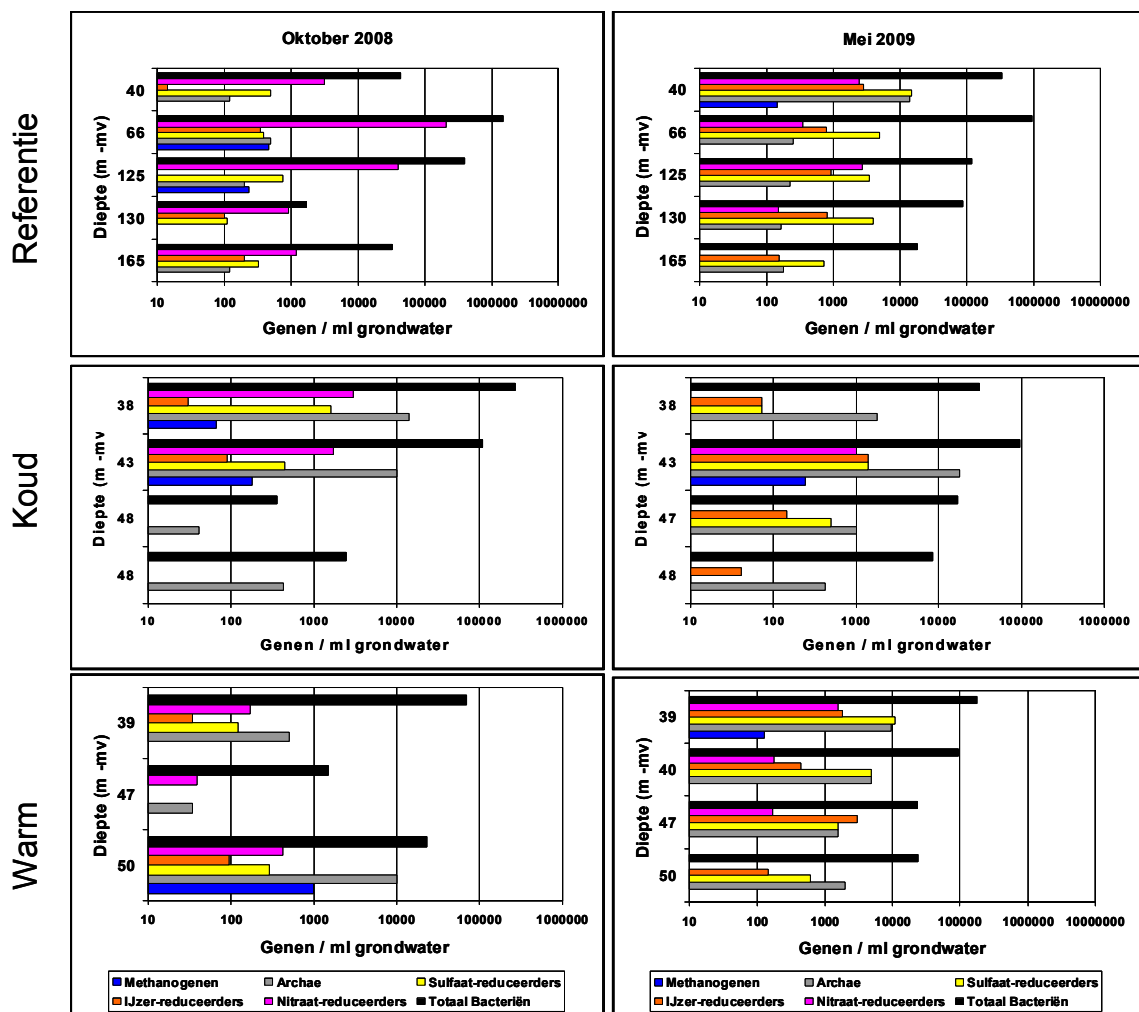
*Kwantitatieve PCR detectie van micro-organismen*

Het totale aantal 16S rDNA genen van bacteriën (Eubacteria) bij WKO Utrecht–Uithof liep in oktober 2008 sterk uiteen, van enkele honderden tot meer dan 1 miljoen per ml grondwater (Figuur 3). In mei 2009 zijn concentraties van ca. 20 duizend tot 1 miljoen 16S rRNA genen per ml grondwater gevonden. Er is geen duidelijk patroon in de wisselende bacterieconcentraties in het grondwater bij WKO Utrecht–Uithof gevonden.

De concentraties van verschillende functionele groepen micro-organismen in het grondwater bij WKO Utrecht–Uithof zijn weergegeven in figuur 4. Dechlorerende bacteriën zijn bij WKO Utrecht–Uithof niet aangetoond (<20 genen/ml). Alle andere geanalyseerde groepen (totaal bacteriën, nitraat-reduceerders, ijzer-reduceerders, sulfaat-reduceerders, archaea en methanogenen) zijn wel gedetecteerd. De meeste verschillende groepen micro-organismen, zijn gevonden in de referentiepeilbuizen. Het relateren van de gemiddelde specifieke genconcentraties van de verschillende groepen bacteriën aan de totaal bacterieel 16S rDNA concentraties, laat tussen oktober 2008 en mei 2009 een toename te zien van respectievelijk, het percentage ijzer-reduceerders (van 0,3% naar 0,8%) en sulfaat-reduceerders (van 0,6% naar 5%). De gemiddelde relatieve genconcentratie van nitraat-reduceerders nam in deze periode juist af (van 4% naar 0,8%). Het gemiddeld aantal methanogene methyl-CoM-reductase was in de meeste peilbuizen bij WKO Utrecht–Uithof 0,5% tot 2% van het gemiddeld aantal Archea 16S rDNA genen. Een uitzondering hierop zijn de referentiepeilbuizen in mei 2009 waar percentages van 98% tot 119% zijn aangetoond. Kennelijk zijn hier de methanogenen de dominante groep Archea.



Figuur 3. Aantallen 16S rDNA genkopieën van bacteriën per ml referentie (groen), warm (rood), of koud (blauw) grondwater van WKO Utrecht-Uithof in oktober 2008 en mei 2009



Figuur 4. Aantallen genen van verschillende functionele groepen micro-organismen per ml grondwater van WKO Utrecht - Uithof in oktober 2008 en mei 2009

### 4.3 Utrecht - Jaarbeurs

#### *Fysische parameters*

Bij WKO Utrecht-Jaarbeurs is op 31 oktober 2008 grondwater uit peilbuizen uit 3 warmte- en 3 koudebronnen bemonsterd (Appendix B). De bemonsterde peilbuizen bevonden zich op een diepte variërend van ongeveer 20 tot 50 meter beneden maaiveld. Het gemiddelde temperatuursverschil tussen de koude en warme grondwaterbronnen was 3°C (koud 11°C; warm 14°C). Het grondwater bij de jaarbeurs was neutraal tot licht basisch (pH 6,9-7,4). De condities waren zuurstofloos en mild reducerend, met redox potentiaal variërend van -76 tot -126 mV. De geleidbaarheid was in de range van 477 tot 760 µS/cm.

#### *Chemische parameters*

Chloride (60 – 300 mg/l) en sulfaat (30 – 120 mg/l) zijn de belangrijkste anionen die zijn waargenomen in het grondwater van WKO Utrecht-Jaarbeurs. In enkele peilbuizen is enig nitraat of fosfaat aangetroffen (1 mg/l). Naast ammonium (0,6 – 6 mg/l) zijn calcium 70 – 190 mg/l, kalium (2 – 111 mg/l), magnesium (8 – 13 mg/l), natrium (33 – 200 mg/l), mangaan (0,4 – 2 mg/l), fosfor (0,2 – 2 mg/l) en ijzer (1,2 – 12 mg/l) in het grondwater aanwezig. Dit duidt op voldoende nutriënten voor microbiële groei. De verhoogde ijzerconcentraties wijzen op de activiteit van ijzer-reducerende bacteriën. Naast anionen en kationen is in het grondwater bij WKO Utrecht-Jaarbeurs vinylchloride (VC) aangetoond. De concentratie was maximaal 1 mg/l. Ook etheen, het anaerobe afbraakproduct van VC, is in een van de bemonsterde peilbuizen gevonden. Andere gechlloreerde ethanen en ethenen zijn niet gevonden. Het NPOC (“niet-vluchtig DOC”) gehalte bij Utrecht – jaarbeurs varieerde van ca. 4 to 9 mg C/L.

#### *Kwantitatieve PCR detectie van micro-organismen*

De kwantitatieve PCR analyses van verschillende bacterie- en archeagroepen bij WKO Utrecht-Jaarbeurs zijn uitgevoerd door een extern bureau (Bioclear, Appendix C). Helaas was de onderste detectielimiet van deze analyses relatief hoog ( $> 10^2$  genen per ml). De concentraties 16S rDNA van bacteriën en Archea variëren van ongeveer  $10^4$  tot  $10^5$  genen per ml (Appendix C, Tabel 1). Opmerkelijk is dat de analyse suggereert dat de Archea in hogere concentraties aanwezig zijn dan bacteriën. Behalve in peilbuis 1003 (38 m –mv) zijn “zwavel oxiderende” micro-organismen niet aangetoond (Appendix 1, Tabel 2). Sulfaat reducerende bacteriën zijn wel gevonden, in concentraties van <230 tot 4800 genen per ml (Appendix C, Tabel 3). Ook ijzer-oxiderende bacteriën zijn in diverse peilbuizen aanwezig (maximaal 4400 genen/ml), terwijl ijzer-reducerende bacteriën alleen in peilbuis 1003 (38 m –mv) zijn gevonden (Appendix C, Tabel 4 en 5). Lage concentraties van nitrificerende bacteriën zijn in twee peilbuizen gevonden (170 – 790 genen/ml) en methanogenen zijn één maal gevonden (Appendix C, Tabel 6 en 7). Geconcludeerd moet echter worden dat deze analyses eigenlijk te ongevoelig zijn om een goed beeld te krijgen van de diversiteit van Micro-organismen bij WKO Utrecht-Jaarbeurs.

Dechlorerende *Dehalococcoides* bacteriën bij WKO Utrecht-Jaarbeurs zijn bepaald door Deltares Appendix B). In tegenstelling tot WKO Lelystad en WKO Utrecht-Uithof zijn deze bacteriën op de jaarbeurslocatie wel aangetoond. De 16S rDNA concentraties van *Dehalococcoides* zijn laag en variëren van <5 tot 90 genen per ml grondwater.



## 5 Conclusies en discussie

Dit onderzoek betreft een verkennende studie naar de invloed van warmte- koudeopslag (WKO) op de geochemie en de samenstelling van microbiële populaties in grondwater. Voor dit onderzoek zijn 3 locaties geselecteerd, waar op verschillende momenten in het jaar (najaar en voorjaar) bemonstering heeft plaatsgevonden van grondwater uit warmte en koudebronnen en referentiepeilbuizen buiten de door WKO thermisch beïnvloede zones. Deze locaties zijn Provinciehuis Flevoland in Lelystad, Deltares-TNO-UU Aardwetenschappen in Utrecht-Uithof, en de Jaarbeurs in Utrecht.

De verschillen in temperatuur tussen de warme en koude bronnen op de drie onderzochte WKO-locaties liepen uiteen van 2 tot 5 graden Celsius. Het is op voorhand op basis van de huidige kennis niet aannemelijk dat deze relatief geringe temperatuursverschillen grote veranderingen in de fysische, chemische en microbiologische samenstelling van het grondwater tot gevolg hebben. Bij de WKO's in Utrecht zijn inderdaad geen grote variaties waargenomen in de zuurgraad, geleidbaarheid, redox-potentiaal en DOC-gehalten van grondwater uit de warmte- en koudebronnen ten opzichte van de referentiepeilbuizen op een overeenkomstige diepte. Verhoogde concentraties van (toxische) metalen zijn niet waargenomen. Dit wijst er op dat deze WKO's de grondwaterchemie niet of nauwelijks beïnvloeden.

Bij WKO Lelystad was de geleidbaarheid hoger dan bij de WKO's in Utrecht. Bovendien is in Lelystad in alle peilbuizen een sterke toename van de geleidbaarheid tussen november 2008 en mei 2009 vastgesteld. Dit komt overeen met verhoogde concentraties chloride in het grondwater. De oorzaak hiervan is niet bekend en de hoge waarden zijn niet goed verklaarbaar. Mogelijke oorzaken kunnen het regenereren van de filters of verzilting zijn. De verhoogde chlorideconcentratie in de referentiepeilbuis kan betekenen dat er op grotere schaal verzilting optreedt of dat (waarschijnlijker) de referentiepeilbuis in de hydrologische invloedssfeer van de WKO ligt. De temperatuur in de referentiepeilbuis was wel constant en dus ligt de referentiepeilbuis buiten de thermische invloedssfeer van de WKO. Aanbevolen wordt om chloride of de elektrische geleidbaarheid gedurende een langere periode te meten.

De analyses van de aantallen kweekbare bacteriën in het grondwater zijn niet eenduidig en laten uiteenlopende resultaten zien. Mogelijk zijn de vastgestelde verschillen het gevolg van de WKO; bv. temperatuursverschil of verandering van grondwaterstroming. Coliforme bacteriën zijn regelmatig aangetroffen in de grondwatermonsters. Dit kan komen door besmetting van grondwater met rioolwater.

Aanbevolen wordt om coliformen te meten bij meerdere systemen en te relateren aan een mogelijke grondwaterstroming vanuit het oppervlak richting de WKO.

Kweekmethoden worden veel gebruikt, maar zijn relatief gevoelig voor variatie in monsternamprocedure, transport en behandeling voor uitplaten. Duidelijk blijkt uit de vergelijking met de kwantitatieve real time PCR analyses, dat met de kweekmethoden slechts een fractie (<10%) van de in het grondwater aanwezige bacteriepopulaties wordt gedetecteerd. Geconcludeerd wordt daarom dat de kweekmethoden geen goed beeld geven van de aantallen en de verschillende microbiële populaties die actief kunnen zijn in het grondwater.

Aanbevolen wordt om metingen op kweekplaten in het verleden met dit gegeven in het achterhoofd te beoordelen. Voor toekomstige metingen wordt aanbevolen moleculaire technieken te gebruiken.

Met real time PCR zijn specifieke genen (DNA) van verschillende groepen micro-organismen in grondwatermonsters gekwantificeerd. Hiermee is een goed beeld verkregen van de aantallen en de diversiteit van microbiële populaties in de warme en koude bronnen en de referentie peilbuizen bij de WKO's. De aantallen 16S rDNA genen van bacteriën liepen uiteen van enkele honderden tot meer dan een miljoen kopieën per ml grondwater. Ieder micro-organisme bevat 1 tot ca. 10 kopieën van deze genen per cel. De hypothese, dat opwarming van het grondwater leidt tot een toename van de bacterieaantallen in het grondwater is in de huidige studie niet bevestigd.

Aanbevolen wordt om bij systemen met een grotere temperatuurverandering het aantal bacteriën te bepalen om te beoordelen of deze veronderstelling bij grotere temperatuursverschillen standhoudt.

Op een uitzondering na waren de aantallen 16S rDNA genen van Archea lager dan die van bacteriën. In sommige grondwatermonsters bleek de Archea-populatie hoofdzakelijk te bestaan uit methanogenen (WKO Utrecht–Uithof, referentiepeilbuizen 66 en 125 m –mv, oktober 2008). Meestal waren de gedetecteerde genen van methanogenen echter veel lager dan die van het totale aantal Archea. Hetzelfde geldt voor de gedetecteerde concentraties van 16S rDNA genen ten opzichte van de concentraties van specifieke genen van de verschillende bacteriegroepen. Hieruit blijkt dat een groot deel van de microbiële populaties nog niet met de huidige methoden wordt gedetecteerd. Dit wijst er op dat nog veel onbekende soorten micro-organismen in het grondwater aanwezig zijn. De functies van deze micro-organismen in het grondwatersysteem zijn nog onbekend.

Aanbevolen wordt om toekomstige conclusies over de bodemecologie niet alleen te baseren op specifieke bekende functionele groepen. Houdt hierbij ook rekening met de brede biodiversiteit en het gegeven dat veel soorten micro-organismen nog niet bekend zijn. In de toekomst zouden opnieuw metingen verricht kunnen worden zodra de fundamentele kennis over bodemecologie toegenomen is.

Dechlorerende bacteriën zijn alleen aangetroffen bij WKO Utrecht–Jaarbeurs. Hier is in het grondwater ook vinylchloride aangetroffen. De aantallen dechlorerende bacteriën waren echter erg laag. Mogelijk komt dit omdat vinylchloride-reducerende bacteriën een voorkeur hebben voor sterk gereduceerde grondwatercondities, die niet bij de onderzochte WKO aanwezig zijn (Van der Zaan *et al.*, 2009). Dit betekent dat beïnvloeding van de grondwatercondities door dosering van reducerend organisch substraat kan leiden tot een toename van de aantallen en de activiteit van dechlorerende bacteriën. Verhoging van de temperatuur alleen is onvoldoende om een goede stimulering van de afbraak van verontreinigende chloorverbindingen te verkrijgen.

De andere functionele bacteriegroepen, nitraat-reduceerders, ijzer-reduceerders en sulfaat-reduceerders, zijn bij alle WKO's gevonden. Bij WKO Lelystad waren de aantallen van deze bacteriegroepen in dezelfde orde van grootte. Bij WKO Utrecht–Uithof waren in oktober 2008 vooral nitraat-reducerende bacteriën numeriek dominant, terwijl in mei 2009 juist relatief hogere aantallen genen van sulfaat- en ijzer-reducerende bacteriën zijn gevonden. We weten niet wat de oorzaak is van de toename van deze bacteriegroepen. Helaas was de gevoeligheid van de moleculaire analyses van bacteriegroepen bij WKO Utrecht–Jaarbeurs onvoldoende om de resultaten te interpreteren.

Aanbevolen wordt om meer metingen op deze en andere locaties te verrichten om meer statistische verbanden tussen groepen micro-organismen en omstandigheden te kunnen leggen.

Opvallend is dat de diversiteit van micro-organismen bij WKO Lelystad en Utrecht–Uithof het grootste was in de referentiepeilbuizen. Zowel in warmte bonnen (b.v. WKO Lelystad, november 2008) als in de koudebronnen (b.v. WKO Lelystad, mei 2009) zijn soms zeer weinig micro-organismen aangetroffen. Het lijkt vanuit de theorie onwaarschijnlijk dat dit het gevolg is van de vastgestelde temperatuursverschillen van slechts enkele graden Celsius. Wellicht kunnen deze waarnemingen verklaard worden door activiteiten bij de WKO's, zoals het mechanisch of chemisch regenereren van infiltratie- en onttrekkingsputten, bovengrondse temperatuur- of drukverschillen, of grotere stroomsnelheden en dynamiek in de bodem. Aanbevolen wordt om metingen te verrichten op meer locaties en de hypothese te toetsen dat WKO effect heeft op de diversiteit en het aantal bacteriën. De diversiteit kan bijvoorbeeld gemeten worden door DGGE-analyses.

Kortom, in dit onderzoek zijn aanwijzingen gevonden dat WKO's de chemische en microbiologische samenstelling van het grondwater kunnen beïnvloeden. Een verbreding van dit huidige onderzoek naar andere WKO's is echter nodig om een statistisch verantwoorde analyse te maken van de mogelijke effecten op de geochemische en microbiologische kwaliteit van het grondwater. Indien er meer metingen beschikbaar zijn, wordt aanbevolen gebruik te maken van statistische technieken (Canoco, principal component analyse). Op dit moment kunnen de mogelijke oorzaken van geconstateerde effecten bij WKO's nog niet worden onderscheiden.

## 6 Literatuur

Gerritse, J. (2006) Moleculaire detectie van microbiële activiteit: snelle en nauwkeurige diagnose van natuurlijke afbraakprocessen. In: Informatie over Bodem en Water, juli 2006, TNO Bouw en Ondergrond, Utrecht, pp. 10-14.

Gerritse, J., Grift, van der, B., Langenhoff, A. (2009) Contaminant behaviour of micro-organics in groundwater. In: Groundwater Monitoring. Edited by Quevauviller, P., Fouillac, A.-M., Grath, J., Ward, R. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 111-143.

Tzeneva, V.A., Hannes, F., Viñas, M., Griffioen, J., Gerritse, J. (2008) Microbiële diversiteit in de geotop op zes boorlocaties in Zuid-Nederland. TNO-rapport 2008-U-R1285/A

Zaan, van der, B., Weert, de, J., Rijnaarts, H., Vos, de, W.M., Smidt, H., Gerritse, J. (2009) Degradation of 1,2-dichloroethane by microbial communities from river sediments at various redox conditions. *Water Research* 43:3207-3216.

Zaan, van der, B., Hannes, F., Hoekstra, N., Vos, de, W.M., Smidt, H., Gerritse, J. (2009) Correlation of *Dehalococcoides* spp. 16S rRNA and vinyl chloride-reductase genes to different geochemical conditions in chloroethene-contaminated groundwater. *Applied Environmental Microbiology*, submitted.

## A Real-time PCR condities

Real-time PCR programma voor alle targets behalve denitrificerende en dechlorerende bacteriën

	Temperatuur	Tijd
Stap 1:	94 °C	3 min
Stap 2:	herhaal deze stap 35 keer 94 °C 58°C 72 °C	30 sec 30 sec 30 sec
Stap 3:	72 °C	5 min
Stap 4:	95 °C	1 min
Stap 5 :	Dissociatie stap : 58 °C → 95 °C	
Stap 6:	4 °C	∞

Real-time PCR programma voor denitrificerende bacteriën

	Temperature	Tijd
Stap 1:	95 °C	15 min
Stap 2:	herhaal deze stap 6 keer 95 °C 63°C-1°C/cycles 72 °C	15 sec 30 sec 30 sec
Stap 3:	herhaal deze stap 40 keer 95 °C X °C 72 °C	15 sec 30 sec 30 sec
Stap 4:	72 °C	5 min
Stap 5:	95 °C	1 min
Stap 6 :	Dissociatie stap : 56 °C → 95 °C	
Stap 7 :	4 °C	∞

## Real-time PCR programma voor alle dechlorerende bacteriën

	Temperatuur	Tijd
Stap 1:	95 °C	3 min
Stap 2:	Herhaal deze stap 40 keer 95 °C 58°C	15 sec 1 min
Stap 3:	72 °C	3 min
Stap 6:	4 °C	∞

## Real-time PCR BioRad Mix

Voor een Real-time PCR is de volgende mix van chemische stoffen en DNA nodig:

*Real-time PCR Biorad mix met cybergreen, 25 µl totaal volume:*

12,5 µl BioRad master mix Sybr Green  
1,5 µl primer forward (10 µM)  
1,5 µl primer reverse (10 µM)  
6,5 µl MQ  
3µl DNA oplossing

*Real-time PCR Biorad mix met IQ mix, 25 µl totaal volume:*

12,5 µl BioRad master mix IQ supermix  
1,5 µl primer forward (10 µM)  
1,5 µl primer reverse (10 µM)  
0,2 µl probe (10 µM)  
6,3 µl MQ  
3µl DNA oplossing

## Real-time PCR calibratielijnen

Voor een controle op de kwaliteit en de efficiëntie van de real-time PCR analyses zijn calibratielijnen gemaakt die specifiek zijn voor elk groep micro-organismen.

## Stappen voor calibratielijnen:

- DNA isolatie van een referentie b.v. een reïncultuur van *Desulfovibrio vulgaris* voor de SRB.
- PCR met de gewenste specifieke primers.
- Zuiveren van het PCR-product met speciale QUIAGEN Kit (QUIAGEN Benelux B.V.).
- Ligatie en transformatie van het gezuiverde PCR-product in TOPO vector en *E. coli* TOP10 competente cellen volgens TOPO cloning instructies (Invitrogen Life Science, the Netherlands).
- Incubatie van de getransformeerde cellen gedurende 1 nacht bij 37 °C op LB medium met Ampicilline. Volgende ochtend zijn witte en blauwe koloniën aanwezig.
- Selecteren van 5-10 witte koloniën en deze over nacht laten groeien bij 37 °C op vloeibare LB medium met Ampicilline.

- Plasmide isolatie met MiniPrep QUIAGEN Kit en insert controle van de plasmide via restrictie en sequencen.
- Plasmide concentratie bepalen.
- Calibratielijn verdunningen maken.

## **B Jaarbeurs**

### **B1 Grondwateranalyses Jaarbeurs**

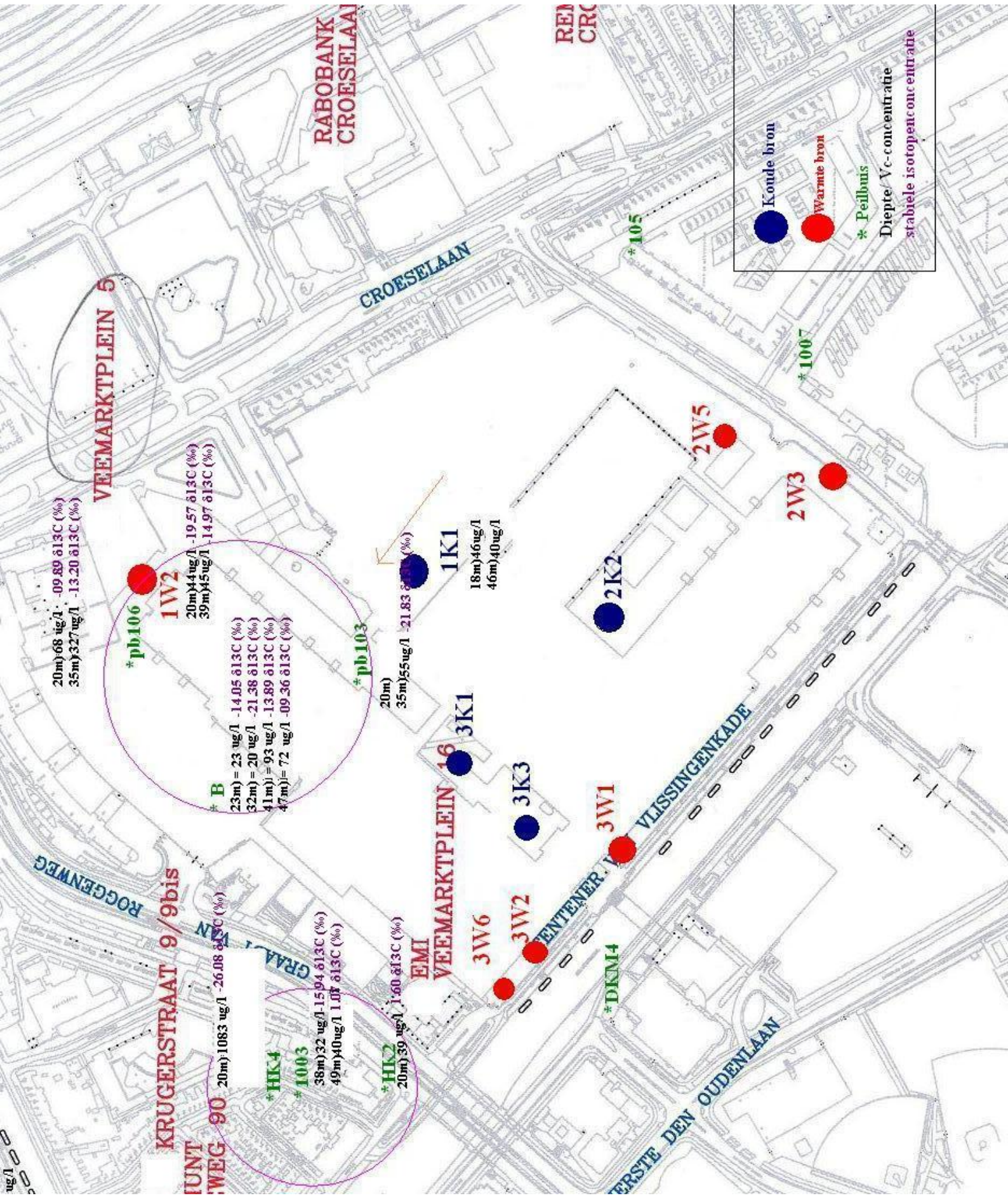




TCE µg/l	PCE µg/l	Chloride (mg/l)	Nitriet (mg/l)	Bromide (mg/l)	Nitraat (mg/l)	Fosfaat (mg/l)	Sulfaat (mg/l)	Stabiele isotopen δ13C (‰) in VC	NH4 mg/l	NPOC mgC/l	Ca mg/l	Fe mg/l	K mg/l	Mg mg/l	Mn mg/l	Na mg/l	P mg/l	gene copies / ml groundwater			
																		Dcoc 16SDNA Taqman	vcrA Taqman	bvcA Taqman	tceA Taqman
<<	<<	183	<<	<<	<<	<<	54		2,7	4,9	136	8,4	5,7	12,6	1,4	100	0,7	9,05E+01	<12	<2	<25
<<	<<	185	<<	<<	1	<<	52		2,0	5,6	138	8,8	5,5	12,2	1,4	101	0,6	<5	<12	<2	<25
<<	<<	147	<<	<<	<<	<<	47		3,3	5,5	90	5,5	3,5	10,1	0,7	75	1,0	6,30E+01	3,67E+01	9,84E+00	<25
<<	<<	162	<<	<<	<<	<<	50	-21,83	1,4	4,2	94	9,7	1,7	8,9	1,0	84	0,6	<5	<12	<2	<25
<<	<<	202	<<	<<	<<	<<	37	-14,05	2,1	6,0	135	10,4	5,1	12,4	1,4	104	0,8	8,15E+01	<12	<2	2,64E+01
<<	<<	174	<<	<<	<<	<<	30	-21,38	1,8	5,8	134	9,8	2,6	11,0	2,0	57	0,4	<5	<12	<2	<25
<<	<<	284	<<	<<	<<	<<	117	-13,89	1,8	8,9	143	5,9	2,6	11,8	0,4	> 197.609	0,2	<5	<12	<2	<25
<<	<<	309	<<	<<	<<	<<	112	-9,36	1,8	5,8	145	6,5	2,5	12,3	0,6	> 192.182	0,2	8,30E+01	<12	<2	2,56E+02
<<	<<	153	<<	<<	<<	<<	51	-26,08	1,2	4,4	133	6,1	6,1	11,8	1,2	75	0,7	<5	<12	<2	<25
<<	<<	61	<<	<<	<<	<<	64	-15,94	2,1	4,6	150	6,7	3,6	12,4	1,9	40	0,2	<5	<12	<2	<25
<<	<<	62	<<	<<	<<	<<	111	1,07	1,9	4,2	> 188.498	12,0	3,3	16,7	0,7	28	0,1	7,65E+01	1,53E+03	<2	<25
<<	<<	205	<<	<<	<<	<<	49	-9,89	0,6	4,7	146	6,1	10,7	12,8	1,8	112	0,4	7,65E+01	3,31E+01	9,08E+00	<25
<<	<<	204	<<	<<	<<	<<	52	-13,20	1,8	5,0	118	10,4	3,7	9,0	1,7	> 123.461	0,6	7,70E+01	3,33E+02	1,59E+02	<25
<<	<<	146	<<	<<	<<	<<	49		2,9	4,4	94	3,9	3,8	11,1	0,7	75	1,0	<5	<12	<2	<25
<<	<<	149	<<	<<	<<	<<	26		4,1	4,9	100	3,7	4,8	11,0	0,9	82	2,0	8,95E+01	<12	<2	<25
<<	<<	228	<<	<<	<<	<<	45		4,5	4,9	128	4,1	3,3	12,0	0,7	100	0,4	9,00E+01	<12	<2	<25
<<	<<	83	<<	<<	<<	1	57		1,3	4,9	72	1,2	4,6	10,1	1,2	46	1,2	<5	<12	<2	<25
<<	<<	87	<<	<<	<<	<<	61		0,6	5,9	74	1,7	5,8	9,8	0,4	50	0,5	7,80E+01	<12	4,17E+00	<25
<<	<<	156	<<	<<	<<	<<	66		3,5	3,8	86	2,0	3,1	8,2	0,4	75	0,1	<5	<12	<2	<25
<<	<<	135	<<	<<	<<	<<	32		6,1	5,2	120	3,6	7,9	14,2	0,7	72	1,9	<5	<12	<2	<25
<<	<<	146	<<	<<	<<	<<	26		3,4	4,7	103	8,6	9,7	12,5	0,8	76	1,0	<5	<12	<2	<25
<<	<<	180	<<	<<	<<	<<	25	1,60	3,5	4,8	98	3,9	5,9	11,0	0,8	85	0,8	<5	<12	<2	<25
<<	<<	185	<<	<<	1	<<	52	-19,57	2,0	5,1	134	9,0	5,5	11,8	1,4	101	0,6	<5	<12	<2	<25
<<	<<	188	<<	<<	<<	<<	52	-14,97	1,9	4,6	136	9,1	5,7	11,8	1,4	102	0,6	8,40E+01	<12	<2	<25
<<	<<	181	<<	<<	<<	<<	36		2,8	5,5	100	4,4	5,3	11,2	0,6	90	1,0	7,90E+01	<12	4,60E+00	<25
<<	<<	150	<<	<<	<<	<<	48		2,8	6,3	97	4,3	4,9	11,0	0,6	81	1,1	8,05E+01	<12	<2	2,79E+01
<<	<<	143	<<	<<	<<	<<	48		2,9	5,3	98	4,4	5,1	11,0	0,6	79	1,1	8,10E+01	<12	<2	3,00E+02
<<	<<	149	<<	<<	<<	<<	45		3,2	6,3	96	5,1	3,9	11,2	0,9	75	1,1	<5	<12	2,74E+00	<25
<<	<<	148	<<	<<	<<	<<	44		3,1	8,8	95	4,4	3,8	10,9	0,8	73	1,0	<5	<12	<2	<25
<<	<<	148	<<	<<	<<	<<	43		2,9	5,0	96	4,9	3,6	11,0	0,8	71	0,9	8,45E+01	<12	<2	<25
<<	<<	138	<<	<<	<<	<<	34		3,4	6,5	113	3,8	5,2	12,5	1,1	75	1,1	<5	<12	<2	<25
<<	<<	147	<<	<<	1	<<	40		3,3	5,6	96	4,8	4,0	10,9	0,8	73	1,1	8,55E+01	<12	<2	2,68E+01

rood: waarde niet betrouwbaar

## **B2 Monsternamepunten Jaarbeurs**



## **C Analyserapport Bioclear**

**Betreft:** Resultaat moleculaire analyses op verschillende bodemfuncties  
**Opdrachtgever:** Deltares  
**Lokatie** Utrecht  
**Project code:** 2008. 3376/5890  
**Datum:** 11 december 2008

---

## 1. INLEIDING

In opdracht van Deltares te Utrecht zijn kwantitatieve moleculaire analyses uitgevoerd om verschillende bodemfuncties aan te tonen in twaalf grondwatermonsters. De analyses zijn uitgevoerd conform gemaakte afspraken per e-mail (d.d. 13 november 2008) en opdrachtverlening met bestelnummer 92000581 d.d. 17 november 2008.

## 2. UITGEVOERDE WERKZAAMHEDEN

De twaalf met ethanol geconserveerde grondwatermonster zijn op 13 november 2008 bij Bioclear aangeleverd.

Middels uitvoering van moleculaire analyses (Q-PCR) kunnen specifiek genetische eigenschappen (gelegen op het DNA) in de aangeleverde grondwatermonsters worden aangetoond, waarmee het aanwezige aantal cellen of functionele genen in monsters zijn gekwantificeerd.

De uitgevoerde analyses bestaan uit de detectie en kwantificatie van:

- totaal aantal bacteriën en archaea;
- zes reacties ter aantoning van zwavel oxidatie (vijf zwaveloxiderende bacteriegroepen en één functioneel zwaveloxidase gen);
- twee reacties ter aantoning van sulfaat reductie (twee functionele sulfietreductase genen);
- drie reacties ter aantoning van ijzer oxidatie (drie ijzeroxiderende bacteriegroepen);
- één reactie ter aantoning van ijzer reductie (één ijzerreducerende bacteriegroep);
- twee reacties ter aantoning van nitrificatie (twee functionele ammonium monooxygenase genen);
- één reactie ter aantoning van methanogenese (één functioneel methyl co-enzym M reductase gen).

### 3. RESULTATEN

Het resultaat van de uitgevoerde moleculaire analyses worden weergegeven in onderstaande tabellen.

**Tabel 1. Analyse resultaten van het totaal aantal bacteriën en archaea. De resultaten zijn weergegeven als aantal cellen (N) per ml grondwater.**

Monstercode	Bacteriën (Art N <sup>o</sup> : P059P427)	Archaea (Art N <sup>o</sup> : P418P419)
Pb 1W2 (39)	3,3 * 10 <sup>4</sup>	2,2 * 10 <sup>5</sup>
Pb 106 (20)	4,9 * 10 <sup>4</sup>	1,8 * 10 <sup>5</sup>
Pb 103 (20)	1,8 * 10 <sup>4</sup>	9,6 * 10 <sup>4</sup>
Pb 3W1 (41,5)	8,2 * 10 <sup>3</sup>	2,4 * 10 <sup>4</sup>
Pb 1K1 (18)	1,7 * 10 <sup>4</sup>	1,4 * 10 <sup>5</sup>
Pb 105 (30)	4,1 * 10 <sup>4</sup>	2,4 * 10 <sup>4</sup>
Pb 1003 (38)	8,3 * 10 <sup>4</sup>	1,4 * 10 <sup>5</sup>
Pb DKM4 (28)	2,1 * 10 <sup>4</sup>	1,8 * 10 <sup>5</sup>
Pb 3K3 (48)	9,1 * 10 <sup>3</sup>	5,2 * 10 <sup>4</sup>
Pb 2W2 (40)	2,9 * 10 <sup>4</sup>	6,8 * 10 <sup>4</sup>
Pb 1007 (36)	1,6 * 10 <sup>4</sup>	6,2 * 10 <sup>4</sup>
Pb 2K2 (44)	3,4 * 10 <sup>4</sup>	6,3 * 10 <sup>4</sup>

De spreiding van de methode ligt tussen 0.5 \* N en 2 \* N  
Het aantal cellen is gebaseerd op de veronderstelling dat 1 DNA-kopie = 1 cel).

**Tabel 2. Analyse resultaten van de zes reacties ter aantoning van zwavel oxidatie. De resultaten zijn weergegeven als aantal cellen (N) per ml grondwater.**

Monstercode	Groep 1 (Art N <sup>o</sup> : P353P354)	Groep 2 (Art N <sup>o</sup> : M098M099)	Groep 3 (Art N <sup>o</sup> : M096M097)	Groep 4 (Art N <sup>o</sup> : M101M102)	Groep 5 (Art N <sup>o</sup> : P673P674)	Groep 6 (Art N <sup>o</sup> : M103M104)
Pb 1W2 (39)	< 2,7 * 10 <sup>2</sup>	< 5,4 * 10 <sup>2</sup>	< 5,4 * 10 <sup>2</sup>	< 5,4 * 10 <sup>2</sup>	< 5,4 * 10 <sup>2</sup>	< 5,4 * 10 <sup>2</sup>
Pb 106 (20)	< 3,3 * 10 <sup>2</sup>	< 6,6 * 10 <sup>2</sup>	< 6,6 * 10 <sup>2</sup>	< 6,6 * 10 <sup>2</sup>	< 6,6 * 10 <sup>2</sup>	< 6,6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 103 (20)	< 1,7 * 10 <sup>2</sup>	< 3,4 * 10 <sup>2</sup>	< 3,4 * 10 <sup>2</sup>	< 3,4 * 10 <sup>2</sup>	< 3,4 * 10 <sup>2</sup>	< 3,4 * 10 <sup>2</sup>
Pb 3W1 (41,5)	< 1,1 * 10 <sup>2</sup>	< 2,3 * 10 <sup>2</sup>	< 2,3 * 10 <sup>2</sup>	< 2,3 * 10 <sup>2</sup>	< 2,3 * 10 <sup>2</sup>	< 2,3 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1K1 (18)	< 3,7 * 10 <sup>2</sup>	< 7,3 * 10 <sup>2</sup>	< 7,3 * 10 <sup>2</sup>	< 7,3 * 10 <sup>2</sup>	< 7,3 * 10 <sup>2</sup>	< 7,3 * 10 <sup>2</sup>
Pb 105 (30)	< 4,9 * 10 <sup>5</sup>	< 9,7 * 10 <sup>2</sup>	< 9,7 * 10 <sup>2</sup>	< 9,7 * 10 <sup>2</sup>	< 9,7 * 10 <sup>2</sup>	< 9,7 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1003 (38)	< 2,9 * 10 <sup>2</sup>	< 5,7 * 10 <sup>2</sup>	< 5,7 * 10 <sup>2</sup>	< 5,7 * 10 <sup>2</sup>	< 5,7 * 10 <sup>2</sup>	1,9 * 10 <sup>4</sup>
Pb DKM4 (28)	< 2,8 * 10 <sup>2</sup>	< 5,6 * 10 <sup>2</sup>	< 5,6 * 10 <sup>2</sup>	< 5,6 * 10 <sup>2</sup>	< 5,6 * 10 <sup>2</sup>	< 5,6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 3K3 (48)	< 1,5 * 10 <sup>2</sup>	< 2,9 * 10 <sup>2</sup>	< 2,9 * 10 <sup>2</sup>	< 2,9 * 10 <sup>2</sup>	< 2,9 * 10 <sup>2</sup>	< 2,9 * 10 <sup>2</sup>
Pb 2W2 (40)	< 1,9 * 10 <sup>2</sup>	< 3,8 * 10 <sup>2</sup>	< 3,8 * 10 <sup>2</sup>	< 3,8 * 10 <sup>2</sup>	< 3,8 * 10 <sup>2</sup>	< 3,8 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1007 (36)	< 1,3 * 10 <sup>2</sup>	< 2,5 * 10 <sup>2</sup>	< 2,5 * 10 <sup>2</sup>	< 2,5 * 10 <sup>2</sup>	< 2,5 * 10 <sup>2</sup>	< 2,5 * 10 <sup>2</sup>
Pb 2K2 (44)	< 1,2 * 10 <sup>2</sup>	< 2,4 * 10 <sup>2</sup>	< 2,4 * 10 <sup>2</sup>	< 2,4 * 10 <sup>2</sup>	< 2,4 * 10 <sup>2</sup>	< 2,4 * 10 <sup>2</sup>

De spreiding van de methode ligt tussen 0.5 \* N en 2 \* N  
Het aantal cellen is gebaseerd op de veronderstelling dat 1 DNA-kopie = 1 cel).

**Tabel 3. Analyse resultaten van de twee reacties ter aantoning van sulfaat reductie. De resultaten zijn weergegeven als aantal cellen (N) per ml grondwater.**

Monstercode	Groep 1 (Art N <sup>o</sup> : M068P491)	Groep 2 (Art N <sup>o</sup> : M077M078)
Pb 1W2 (39)	< 5.4*10 <sup>2</sup>	1.8*10 <sup>3</sup>
Pb 106 (20)	1.9*10 <sup>3</sup>	1.5*10 <sup>4</sup>
Pb 103 (20)	< 3.4*10 <sup>2</sup>	3.7*10 <sup>2</sup>
Pb 3W1 (41,5)	< 2.3*10 <sup>2</sup>	5.1*10 <sup>2</sup>
Pb 1K1 (18)	< 7.3*10 <sup>2</sup>	< 7.3*10 <sup>2</sup>
Pb 105 (30)	< 9.7*10 <sup>2</sup>	1.4*10 <sup>3</sup>
Pb 1003 (38)	6.8*10 <sup>2</sup>	1.8*10 <sup>3</sup>
Pb DKM4 (28)	< 5.6*10 <sup>2</sup>	6.2*10 <sup>2</sup>
Pb 3K3 (48)	< 2.9*10 <sup>2</sup>	4.8*10 <sup>3</sup>
Pb 2W2 (40)	< 3.8*10 <sup>2</sup>	1.2*10 <sup>3</sup>
Pb 1007 (36)	< 2.5*10 <sup>2</sup>	< 2.5*10 <sup>2</sup>
Pb 2K2 (44)	< 2.4*10 <sup>2</sup>	1.5*10 <sup>3</sup>

De spreiding van de methode ligt tussen 0.5 \* N en 2 \* N  
 Het aantal cellen is gebaseerd op de veronderstelling dat 1 DNA-kopie = 1 cel).

**Tabel 4. Analyse resultaten van de drie reacties ter aantoning van ijzer oxidatie. De resultaten zijn weergegeven als aantal cellen (N) per ml grondwater.**

Monstercode	Groep 1 (Art N <sup>o</sup> : P195P196)	Groep 2 (Art N <sup>o</sup> : P554M076)	Groep 3 (Art N <sup>o</sup> : M017P194)
Pb 1W2 (39)	< 5.4*10 <sup>2</sup>	5.5*10 <sup>2</sup>	< 5.4*10 <sup>2</sup>
Pb 106 (20)	< 6.6*10 <sup>2</sup>	< 6.6*10 <sup>2</sup>	< 6.6*10 <sup>2</sup>
Pb 103 (20)	< 3.4*10 <sup>2</sup>	4.5*10 <sup>2</sup>	< 3.4*10 <sup>2</sup>
Pb 3W1 (41,5)	< 2.3*10 <sup>2</sup>	3.3*10 <sup>3</sup>	< 2.3*10 <sup>2</sup>
Pb 1K1 (18)	< 7.3*10 <sup>2</sup>	< 7.3*10 <sup>2</sup>	< 7.4*10 <sup>2</sup>
Pb 105 (30)	< 9.7*10 <sup>2</sup>	< 9.7*10 <sup>2</sup>	< 9.7*10 <sup>2</sup>
Pb 1003 (38)	< 5.7*10 <sup>2</sup>	4.1*10 <sup>4</sup>	< 5.7*10 <sup>2</sup>
Pb DKM4 (28)	< 5.6*10 <sup>2</sup>	< 5.6*10 <sup>2</sup>	< 5.6*10 <sup>2</sup>
Pb 3K3 (48)	< 2.9*10 <sup>2</sup>	7.5*10 <sup>2</sup>	< 2.9*10 <sup>2</sup>
Pb 2W2 (40)	< 3.8*10 <sup>2</sup>	9.7*10 <sup>2</sup>	< 3.8*10 <sup>2</sup>
Pb 1007 (36)	< 2.5*10 <sup>2</sup>	4.8*10 <sup>3</sup>	< 2.5*10 <sup>2</sup>
Pb 2K2 (44)	< 2.4*10 <sup>2</sup>	< 2.4*10 <sup>2</sup>	< 2.4*10 <sup>2</sup>

De spreiding van de methode ligt tussen 0.5 \* N en 2 \* N  
 Het aantal cellen is gebaseerd op de veronderstelling dat 1 DNA-kopie = 1 cel).



**Tabel 5. Analyse resultaat van de reactie ter aantoning van ijzer reductie. De resultaten zijn weergegeven als aantal cellen (N) per ml grondwater.**

Monstercode	Groep 1 (Art N <sup>o</sup> : M070P499)
Pb 1W2 (39)	< 5.4 * 10 <sup>2</sup>
Pb 106 (20)	< 6.6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 103 (20)	< 3.4 * 10 <sup>2</sup>
Pb 3W1 (41,5)	< 2.3 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1K1 (18)	< 7.3 * 10 <sup>2</sup>
Pb 105 (30)	< 9.7 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1003 (38)	7.6 * 10 <sup>3</sup>
Pb DKM4 (28)	< 5.6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 3K3 (48)	< 2.9 * 10 <sup>2</sup>
Pb 2W2 (40)	< 3.8 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1007 (36)	< 2.5 * 10 <sup>2</sup>
Pb 2K2 (44)	< 2.4 * 10 <sup>2</sup>

De spreiding van de methode ligt tussen 0.5 \* N en 2 \* N  
 Het aantal cellen is gebaseerd op de veronderstelling dat 1 DNA-kopie = 1 cel).

**Tabel 6. Analyse resultaten van de twee reacties ter aantoning van nitrificatie. De resultaten zijn weergegeven als aantal cellen (N) per ml grondwater.**

Monstercode	Groep 1 (Art N <sup>o</sup> : M085M086)	Groep 2 (Art N <sup>o</sup> : M087M088)
Pb 1W2 (39)	< 1.6 * 10 <sup>2</sup>	< 1.6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 106 (20)	< 1.9 * 10 <sup>2</sup>	< 1.9 * 10 <sup>2</sup>
Pb 103 (20)	< 9.8 * 10 <sup>1</sup>	< 9.8 * 10 <sup>1</sup>
Pb 3W1 (41,5)	< 6.4 * 10 <sup>1</sup>	< 6.4 * 10 <sup>1</sup>
Pb 1K1 (18)	< 2.1 * 10 <sup>2</sup>	< 2.1 * 10 <sup>2</sup>
Pb 105 (30)	< 2.8 * 10 <sup>2</sup>	< 2.8 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1003 (38)	1.7 * 10 <sup>2</sup>	< 1.6 * 10 <sup>2</sup>
Pb DKM4 (28)	< 1.6 * 10 <sup>2</sup>	< 1.6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 3K3 (48)	< 8.3 * 10 <sup>1</sup>	< 8.3 * 10 <sup>1</sup>
Pb 2W2 (40)	< 1.1 * 10 <sup>2</sup>	< 1.1 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1007 (36)	< 7.1 * 10 <sup>1</sup>	< 7.1 * 10 <sup>1</sup>
Pb 2K2 (44)	7.9 * 10 <sup>2</sup>	< 6.8 * 10 <sup>1</sup>

De spreiding van de methode ligt tussen 0.5 \* N en 2 \* N  
 Het aantal cellen is gebaseerd op de veronderstelling dat 1 DNA-kopie = 1 cel).

**Tabel 7. Analyse resultaat van de reactie ter aantoning van methanogenese. De resultaten zijn weergegeven als aantal cellen (N) per ml grondwater.**

---

<b>Monstercode</b>	<b>Groep 1 (Art N<sup>o</sup>: M105M106)</b>
Pb 1W2 (39)	< 5.4 * 10 <sup>2</sup>
Pb 106 (20)	< 6.6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 103 (20)	< 3.4 * 10 <sup>2</sup>
Pb 3W1 (41,5)	< 2.3 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1K1 (18)	< 7.3 * 10 <sup>2</sup>
Pb 105 (30)	< 9.7 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1003 (38)	< 5.7 * 10 <sup>2</sup>
Pb DKM4 (28)	< 5.6 * 10 <sup>2</sup>
Pb 3K3 (48)	7.4 * 10 <sup>2</sup>
Pb 2W2 (40)	< 3.8 * 10 <sup>2</sup>
Pb 1007 (36)	< 2.5 * 10 <sup>2</sup>
Pb 2K2 (44)	< 2.4 * 10 <sup>2</sup>

---

De spreiding van de methode ligt tussen 0.5 \* N en 2 \* N  
Het aantal cellen is gebaseerd op de veronderstelling dat 1 DNA-kopie = 1 cel).