Bacteriën in het watervoerende pakket van de bodem

Samenvatting
In de ondergrond bevindt zich een groot aantal bacteriën die belangrijk zijn voor de afbraak van natuurlijke organische verbindingen. De ademhaling van deze bacteriën maakt van het zuurstofrijke regenwater zuurstofarm grondwater. Wanneer het grondwater verontreinigd wordt door een vuilstort ontstaat een pluim van verontreinigd grondwater met daarin een veranderde microflora die aangepast is aan de vervuiling. Deze geadapteerde microflora is vaak beter in staat om sommige milieuvreemde stoffen af te breken dan de oorspronkelijke autochtone bacteriën. Ongunstige milieu-omstandigheden en toxische effecten kunnen de afbraak echter sterk vertragen.
De adaptatie van de autochtone bacteriën aan de afbraak van microverontreinigingen is gebonden aan een drempel-concentratie waaronder geen adaptatie meer kan plaatsvinden. Zonder adaptatie gaat de afbraak van milieuvreemde verbindingen zeer langzaam. Doordat de autochtone bacteriën de concentratie aan voedingsstoffen in het grondwater laag houden, wordt de overlevingstijd van ziekteverwekkers in het grondwater sterk bekort.



DR. P. VAN BEELEN
RIVM

1. Inleiding

Lange tijd werd aangenomen dat het Nederlandse grondwater vrij van bacteriën en andere micro-organismen zou zijn. Deze veronderstelling was gebaseerd op het feit dat met de traditionele microbiologische technieken weinig micro-organismen aangetoond konden worden in grondwater. Bij de dikwijls toegepaste agarplaatmethode wordt een klein beetje verdund grondwater op een voedingsmedium gebracht. Wanneer in dit grondwater een bacterie aanwezig is die op het voedingsmedium kan groeien dan zal er rond de plaats van de oorspronkelijke bacterie een met het blote oog zichtbaar hoopje bacteriën ontstaan. Door het aantal van deze kolonies te tellen kan het oorspronkelijke aantal bacteriën bepaald worden. Deze methode geeft heel lage aantallen micro-organismen in het grondwater te zien. In dit artikel wordt aangetoond dat de Nederlandse ondergrond in werkelijkheid hoge aantallen bacteriën bevat en wordt ingegaan op de mogelijke rol hiervan bij de handhaving van de grondwaterkwaliteit.

2. De levensomstandigheden van bacteriën in de ondergrond

Recente onderzoekingen hebben aangetoond dat de traditionele agarplaatmethode een grove onderschatting van het aantal bacteriën in de bodem te zien geeft. In de eerste plaats zijn de meeste micro-organismen in de Nederlandse ondergrond aangepast aan hun milieu. Het is er koud, donker en er heerst een gebrek aan voedingsstoffen en vaak ook aan zuurstof. Het blijkt dan ook dat maar een heel klein percentage van deze microflora in staat is om op een voedselrijke, zuurstof-verzadigde en warme agarplaat te groeien. Maar ook een voedselarme agarplaat met grondextract en grondwater bereid, geeft een onderschatting van het aantal bacteriën te zien. Dit wordt veroorzaakt doordat veel bacteriën tijdens een hongerperiode in een soort slaap-fase terechtkomen waarin ze niet meer in staat zijn om snel te groeien [Colwell, 1987]. Nu is voedsel meestal de groei-beperkende factor voor micro-organismen onder natuurlijke omstandigheden.

Zonder groeibeperkende factoren zou één enkele bacterie met een diameter van 0,8 micrometer na 2 dagen en 7 uur de aarde met een 1 meter dikke laag nakomelingen bedekken wanneer zij iedere 30 minuten zouden delen. De meeste bodembacteriën zijn aangepast aan lage voedselconcentraties en zullen wanneer ze op een geschikte agarplaat gebracht worden slechts een kleine kans hebben om tot groei over te gaan.

3. Het aantal bacteriën in de ondergrond

Omdat in de bovengrond 10^8 - 10^{10} bacteriën per gram grond aanwezig zijn is het in de eerste plaats belangrijk een geschikte boringstechniek te gebruiken waarbij monsters kunnen worden genomen die niet besmet zijn door de bovengrond. Door Wilson [1983] werd een methode ontwikkeld voor de monstername uit de ondergrond zonder besmetting van buitenaf. Deze methode werd later door ons verbeterd en geschikt gemaakt voor het nemen van monsters zonder toetreding van lucht [Van Beelen, 1988]. Met behulp van fluorescentie-microscopische tellingen kan men een meer betrouwbare schatting maken van het aantal in de ondergrond aanwezige micro-organismen dan met de agarplaat-methode. De meest gebruikte methode om een fluorescentie-microscopische telling te maken is de Acridine-Oranje-methode. Hierbij worden de bacteriën van de grond-deeltjes losgemaakt in een mixer met behulp van een oppervlaktespanningverlagend middel. Daarna wordt de suspensie 10.000 maal verdund. Deze verdunde grondsuspensie wordt vervolgens gefiltreerd over een 0,2 micrometer filter zodat alle bacteriën op het filter worden opgevangen en gekleurd kunnen worden met Acridine Oranje. Deze stof kleurt het DNA en het RNA in de bacteriën. Het gehele filter wordt onder de fluorescentiemicroscoop gebracht waar de bacteriën geteld kunnen worden. Het bleek dat de meeste bodembacteriën in de verzadigde zone gehecht zijn aan bodemdeeltjes. Amerikaanse onderzoekers vonden 10^6 - 10^8 bacteriën per gram ondergrond in zandige watervoerende pakketten. In Nederland werden 10^8 tot 10^9 bacteriën per gram zandgrond gevonden op diepten van 12 tot 45 meter terwijl in ondiep veen wel 10^{10} bacteriën per gram geteld werden [Van Beelen, 1988]. Hieruit blijkt dat het watervoerend pakket vrij hoge aantallen bacteriën bevat. Opmerkelijk is dat het aantal bacteriën niet sterk afneemt met de diepte zodat er een grote biomassa van bacteriën aanwezig is in het totale pakket. Er zijn in Amerika zelfs bacteriën aangetoond tot op 1.800 meter diepte [Olson, 1981].

4. Afbraak van natuurlijke en synthetische organische verbindingen

Wanneer natuurlijke organische stoffen of milieuvreemde verbindingen op de bodem worden gestort dan kunnen deze verbindingen in principe met het regenwater naar het grondwater spoelen. Door adsorptie aan humus of kleideeltjes kunnen veel stoffen het grondwater niet bereiken. Ook worden veel organische verbindingen op hun weg naar de ondergrond door bodembacteriën en schimmels afgebroken zodat ze het grondwater niet snel kunnen vervuilen. Helaas bevatten natuurlijke bodems vaak gaten en scheuren waardoor goed adsorbeerbare stoffen toch in het grondwater terecht kunnen komen via de zogenaamde kortsluitstromen. Daarnaast kunnen de milieu-omstandigheden in de bovengrond zodanig zijn dat de microbiologische afbraak niet snel verloopt. Vooral 's winters bij lage temperaturen en overvloedige regenval zal de afbraak in de bovengrond een kleinere rol spelen. Van groot belang is daarbij ook de hoogte van het grondwaterpeil; bij een laag grondwaterpeil is over het algemeen meer tijd beschikbaar voordat het regenwater het grondwater bereikt. Door de ademhaling van de bacteriën in de ondergrond wordt de opgeloste zuurstof vaak geheel verbruikt zodat zuurstofloos (anaëroob) grondwater ontstaat. Wanneer nog voldoende natuurlijke organische stoffen in het grondwater aanwezig zijn kan nitraat gereduceerd worden tot stikstofgas. Vervolgens worden ijzer en

mangaan-zouten gereduceerd zodat Fe^{2+} en Mn^{2+} gevormd worden. Wanneer ook nog sulfaat aanwezig is dan wordt deze stof gereduceerd tot het naar rotte eieren stinkende H_2S. In bodems met zeer veel organisch materiaal kan uiteindelijk methaangas gevormd worden. Dit laatste kan alleen als de bodem niet te zuur is omdat methaanvormende bacteriën niet kunnen leven bij een lage pH. Deze eigenschap maakt dat zure veengrond stabiel is zolang het grondwaterpeil hoog genoeg is.

De volgorde van de oxydator die gebruikt wordt voor de oxydatie van organisch materiaal wordt bepaald door de thermodynamische vrije energie die bij de reactie gevormd wordt. Eerst zuurstof, dan nitraat, vervolgens ijzer en mangaan en tenslotte sulfaat en methaanvorming. Hierdoor is nitraat in grondwater van een zandpakket rijk aan zuurstof en arm aan organisch materiaal zo moeilijk te verwijderen.
De bacteriën gebruiken de oxydator die de meeste energie voor hun groei oplevert en zullen geen nitraat gebruiken zolang er zuurstof aanwezig is.

5. Adaptatie van de autochtone microflora aan milieuvreemde verbindingen

Onder een slecht geïsoleerde vuilstort ontstaat een pluim van verontreinigd grondwater. Aan de randen van deze pluim bevindt zich over het algemeen een aan de verontreiniging aangepaste microflora die leeft van de afbraak van sommige stoffen in het vervuilde grondwater. Deze geadapteerde microflora is veel beter in staat om de vervuiling af te breken dan de originele autochtone microflora. Veel stoffen blijken dan ook onder dit soort omstandigheden afbreekbaar te zijn. Gerapporteerd zijn de afbraak van petroleum, olie, fenol, creosoot, chloorfenol, alkylpyridines, hexachloorethaan, alkylbenzeen, chloorbenzeen, gehalogeneerde alifatische koolwaterstoffen, trichlooretheen, dibroomethaan, nitraat, nitriloacetaat en van vele andere stoffen in vervuild grondwater. Vaak zijn onder zo'n vuilstort ook veel grotere aantallen bacteriën per gram grond te vinden. De conclusie dat men dus maar alles in de ondergrond zou mogen dumpen omdat het toch in het grondwater zal worden afgebroken is echter niet gerechtvaardigd. In principe goed afbreekbare verbindingen kunnen in zulke hoge concentraties aanwezig zijn dat ze toxisch zijn voor micro-organismen zodat de biodegradatie belemmerd wordt. Vanuit gebieden met een geconcentreerde verontreiniging lekt dan steeds een kleine hoeveelheid naar het grondwater zodat tientallen jaren later nog steeds een snel afbreekbare verbinding in het grondwater terug is te vinden [Pignatello, 1987].

Ook kunnen ongunstige milieu-omstandigheden zoals een lage grondwatertemperatuur, gebrek aan voedingsstoffen of een te hoge zuurgraad een belemmering vormen voor de biodegradatie. Voor de reductie van gehalogeneerde verbindingen is vaak een anaëroob milieu nodig terwijl voor de snelle afbraak van aromatische verbindingen meestal zuurstof nodig is. Van doorslaggevend belang voor de biodegradatie van een xenobiotische stof is echter de vaak te lage concentratie voor biodegradatie. Wanneer organische microverontreinigingen beneden een bepaalde drempelconcentratie in het milieu voorkomen dan zal de oorspronkelijke microflora niet in staat zijn om zich aan de afbraak van die verontreiniging te adapteren. Dit wordt vermoedelijk veroorzaakt doordat een bacterie die een bepaalde stof kan afbreken pas een selectief voordeel boven andere bacteriën kan verwerven zodra de concentratie van die stof hoog genoeg is om die bacterie sneller te laten groeien dan zijn concurrenten. Voor para-nitrofenol ligt die drempel-concentratie ongeveer op 1 microgram per liter voor de aërobe afbraak in riviersediment [Spain, 1983]. Beneden deze grens is er voor de specifieke para-nitrofenol consumerende bacteriën te weinig voedsel aanwezig om te kunnen groeien. Voor de afbraak van microverontreinigingen in de verzadigde zone van de bodem zijn we dus over het algemeen afhankelijk van de autochtone microflora in die zone. Dit is jammer omdat zonder adaptatie de biodegradatie van veel milieuvreemde verbindingen niet of zeer langzaam zal plaatsvinden.

6. Verwijdering van ziekteverwekkers

Een andere functie van die autochtone microflora is het elimineren van ziekteverwekkers uit het grondwater. Dit is erg belangrijk in ontwikkelingslanden, maar ook in de Verenigde Staten worden nog enige duizenden mensen per jaar ziek door pathogene bacteriën en virussen in het grondwater. De overlevingstijd van deze pathogenen in grondwater wordt sterk bekort door de antagonistische werking van de autochtone microflora [Bitton & Gerba, 1983]. Dit wordt onder andere veroorzaakt doordat deze microflora de concentratie aan voedingsstoffen laag houdt zodat de pathogeen geen voedsel voor zijn overleving tot zijn beschikking heeft. Daarnaast scheidt de autochtone microflora veel stoffen uit met een antimicrobiële werking die de geïntroduceerde micro-organismen kunnen doden.

Literatuur

Colwell, R. R. e.a. (1985). *Viable but non-culturable Vibrio cholerae and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered micro-organisms.* Bio/technology 3, 817-820.

Wilson, J. T. e.a. (1983). *Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shalllow water-table aquifer.* Ground water 21, 134-141.

Beelen, P. van and Fleuren-Kemilä, A. K. (1988). *Enumeration of anaerobic and oligotrophic bacteria in subsoils and sediments.* J. Contamin. Hydrol. in press.

Olson, G. J. e.a. (1981). *Sulfate-reducing and methanogenic bacteria from deep aquifers in Montana.* Geomicrobiol. J. 2, 327-340.

Pignatello, J. J. (1987). *Microbial degradation of 1,2-dibromoethane in shallow aquifer materials.* J. Environ. Qual. 16, 307-312.

Spain, J. C. and Veld, P. A. van (1983). *Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds. Effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure.* Apl. Environ. Microbiol. 45, 428-435.

Bitton, G. and Gerba, C. P. (1984). *Groundwater pollution microbiology.* John Wiley & Sons New York Chicester Brisbane Toronto Singapore.

● ● ●