

HYDROCHIP: DE TOEKOMST VAN MONITORING, DE MONITORING VAN DE TOEKOMST



RAPPORT

2012
39

HYDROCHIP: DE TOEKOMST VAN MONITORING,
MONITORING VAN DE TOEKOMST

RAPPORT

2012

39

ISBN 978.90.5773.576.9



Publicaties van de STOWA kunt u bestellen op www.stowa.nl

COLOFON

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

AUTEURS Marco Jaspers (TNO; red.), H. Cremer (TNO), G. van Ee (Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier), B. de Graaf (Vitens), R. van der Oost (Waternet), F. Schuren (TNO), T. van der Wijngaart (STOWA)

PROJECTGROEP TNO, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, STOWA, Vitens, Waternet

REFERAAT In de periode 2010-2012 werd de Hydrochip ontwikkeld. De Hydrochip is een moleculaire chip die toegepast wordt om op basis van soort-specifieke DNA sequenties snel en betrouwbaar een overzicht te verkrijgen van de kiezelalgen in water- en aangroeimonsters.

TREFWOORDEN Hydrochip, kiezelalgen, determinatie, DNA-technieken

FOTO VOORKANT Onderwerp: Tienhovensche Plassen opgenomen vanuit de Dwarsdijk in Tienhoven
Fotograaf: H. Cremer

DRUK Kruyt Grafisch Adviesbureau
STOWA STOWA 2012-39
ISBN 978.90.5773.576.9

COPYRIGHT De informatie uit dit rapport mag worden overgenomen, mits met bronvermelding. De in het rapport ontwikkelde, dan wel verzamelde kennis is om niet verkrijgbaar. De eventuele kosten die STOWA voor publicaties in rekening brengt, zijn uitsluitend kosten voor het vormgeven, vermenigvuldigen en verzenden.

DISCLAIMER Dit rapport is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten bij toepassing ervan de resultaten te allen tijde kritisch worden beschouwd. De auteurs en STOWA kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het gedachtegoed uit dit rapport.

TEN GELEIDE

Meten om te weten hoe de toestand van het water is: een belangrijke activiteit van de waterbeheerder. Om waterkwaliteitsdoelen en ecologische doelen te behalen worden chemische en biologische parameters gemeten in veel wateren in Nederland. Wat moet worden gemeten voor welke vraag is een belangrijk onderwerp van onderzoek. Maar ook de manier waarop we kunnen meten. Het Hydrochip project heeft zich gericht op het bepalen van de soorten algen in het water door middel van DNA-analyse. De huidige methode gaat uit van het bekijken van een watermonster door een microscoop. Een hele verandering dus!

Het perspectief is veelbelovend. De Hydrochip kan belangrijke implicaties hebben voor de monitoring die de Kaderrichtlijn Water vereist om te controleren of de doelstellingen van deze KRW, worden gehaald. Ook voor de Zwemwaterrichtlijn zijn mogelijkheden. De KRW monitoring moet ondermeer inzicht geven in de in het water voorkomende organismen, van klein tot groot, van de kleinste algen en wieren tot volwassen vissen. De huidige manier van het vaststellen van het voorkomen van al deze soorten is vaak een tijdrovende en dure klus. Met de inzet van DNA-technologie lijkt echter een heel andere en veel snellere manier binnen bereik te komen. De eerste schreden op dit pad zijn nu gezet. Het voorliggende rapport toont aan dat men erin is geslaagd een chip te maken waardoor relatief snel de belangrijkste soorten kiezelalgen in een watermonster kunnen worden bepaald.

Het consortium van partijen dat bij dit project berokken is¹, zal binnen een EU LIFE project (start november 2012) over een periode van 4 jaar de Hydrochip verder ontwikkelen. Wanneer dit voortvarend verloopt, zou de chip over vier jaar in routinematige monitoringswerkzaamheden gebruikt kunnen gaan worden.



Bas van der Wal
Stowa

1 Het project Hydrochip is onder de penvoering van de STOWA tot stand gekomen in een zeer stimulerende samenwerking met TNO, Vitens, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier en Waternet. Het onderzoek was onderdeel van het onderzoeksprogramma Watermozaïek (STOWA). Het project is mede gefinancierd vanuit het Innovatieprogramma Kaderrichtlijn Water van het ministerie van Infrastructuur en Milieu.

SAMENVATTING

In het kader van het kennisprogramma Watermozaïek van de Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA) werd in de periode 2010-2012 het Hydrochip project uitgevoerd. Dit gebeurde in een consortium bestaande uit het Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, STOWA, TNO, Vitens en Waternet. Het project heeft als doel om via de verdere ontwikkeling van een DNA chip een snelle en kostenefficiënte monitoring van de waterkwaliteit mogelijk te maken.

In het Hydrochip project is een chip voor kiezelalgen ontwikkeld, die relatief snel de belangrijkste soorten kiezelalgen in watermonsters kan identificeren. Hiertoe wordt gebruik gemaakt van soort-specifieke stukjes DNA (probes of targets), die op het oppervlak van de Hydrochip zijn aangebracht en die in staat zijn om DNA van specifieke kiezelalgen uit oppervlaktewateren te herkennen. De soort-specifieke DNA probes die deel uitmaken van de Hydrochip zijn via drie verschillende bronnen verzameld: 1. DNA databases zoals GenBank, 2. Kweek van geselecteerde kiezelalgen soorten, gevolgd door isolatie en detectie van de soort-specifieke DNA sequentie, en 3. de 'single cell' aanpak: hierbij wordt het DNA uit een enkele kiezelalgcél geïsoleerd en na vermenigvuldiging hiervan wordt de soortspecifieke DNA-sequentie bepaald.

De Hydrochip kan op dit moment 74 van de 150 meest in Nederland voorkomende kiezelalgensoorten herkennen. Om de Hydrochip te testen, werden habitattyperingen van meer dan 180 water- en substraatmonsters uitgevoerd. Hierbij werd in elk monster de kiezelalgen-gemeenschap door middel van lichtmicroscopie en de Hydrochip onderzocht. Een vergelijking tussen de indicatiewaarden voor trofiegraad, berekend op basis van beide analysemethoden, laat zien dat de overeenstemming voor eutrofe monsters al relatief goed is. Voor oligotrofe en mesotrofe monsters, liggen de waarden verder uit elkaar omdat de Hydrochip nog nauwelijks specifieke DNA-sequenties van oligotrofe en mesotrofe kiezelalgen bevat.

Om de Hydrochip routinematig in de praktijk te kunnen toepassen is daarom nog verdere ontwikkeling nodig. Zo zullen DNA sequenties van in Nederland veel voorkomende oligo- en mesotrofe kiezelalgen aan de Hydrochip toegevoegd moeten worden om de inzetbaarheid van de Hydrochip te verbreden. Dit vervolgonderzoek zal door hetzelfde consortium worden uitgevoerd in het kader van een EU LIFE+ project, gericht op de succesvolle implementatie van de Hydrochip. Door gebruik te maken van generieke DNA-technologie zal de Hydrochip in de toekomst ook andere, voor Nederlandse wateren relevante organismen kunnen opsporen, denk hierbij bijvoorbeeld aan blauwalgen en macrofauna.

STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. Dat zijn alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen en de provincies.

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van inventarisaties van de behoefte bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstututen en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, zonodig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n 6,5 miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: 033 - 460 32 00.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 2180, 3800 CD Amersfoort.

Email: stowa@stowa.nl.

Website: www.stowa.nl

HYDROCHIP: DE TOEKOMST VAN MONITORING, MONITORING VAN DE TOEKOMST

INHOUD

	TEN GELEIDE SAMENVATTING STOWA IN HET KORT	
1	INLEIDING	1
2	HOE WERKT DE HYDROCHIP?	4
3	ONTWIKKELING HYDROCHIP	7
4	RESULTATEN	13
5	DISCUSSIE	19
6	SLOTOPMERKING	20
7	LITERATUUR	21

1

INLEIDING

KRW-MONITORING: NU

Een goede kwaliteit van het oppervlaktewater is van essentieel belang voor gezonde aquatische ecosystemen. Maar ook voor allerlei andere functies van het water, zoals visserij, recreatie en drinkwaterproductie. De kwaliteit van het oppervlaktewater in Nederland staat op veel plaatsen echter onder druk, vooral door eutrofiëring (overmatige belasting met voedingsstoffen), strakke waterpeilen en harde oeverbeschoeiingen. Waterbeheerders houden de ecologische kwaliteit van de Nederlandse oppervlaktewateren daarom nauwlettend in de gaten. Deze monitoring vormt de basis voor effectief en doelmatig beheer en onderhoud, en voor het nemen van de juiste herstelmaatregelen, in het kader van de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) en de Zwemwaterrichtlijn.

Door de komst van de KRW is in het waterbeheer de nadruk komen te liggen op ecologie als het gaat om de beoordeling van de kwaliteit van oppervlaktewater. In schoon en gezond water bevinden zich allerlei soorten dieren en planten in bepaalde hoeveelheden en verhoudingen. Met behulp van KRW-maatlatten worden, voor een bepaald water, de daarin aanwezige soorten (en hun aantallen) uitgedrukt in een bepaalde waarde ten opzicht van schoon water (de referentie of het doel). Ook de fysisch-chemische kwaliteit wordt meegenomen in de beoordeling. Essentieel is dat de aanwezige diersoorten, plantensoorten en micro-organismen (kiezelalgen, blauwalgen) goed kunnen worden vastgesteld met reproduceerbare en representatieve meetmethoden en met correcte namen van de aangetroffen soorten.

De ecologische monitoring bestaat nu uit het bemonsteren en analyseren van veldmonsters door gespecialiseerde medewerkers, die hiervoor naast de protocollen vooral afgaan op hun ervaring en kennis. Omdat de resultaten vergelijkbaar moeten zijn met die van hun collega's in binnen- en buitenland zijn er handboeken en voorschriften. Het Handboek Hydrobiologie [1] is hiervan een voorbeeld.

Eén van de belangrijkste wettelijk verplichte onderdelen bij het onderzoek naar de waterkwaliteit is het vaststellen van de aanwezige soorten planten, dieren en micro-organismen. De KRW vraagt specifiek om onderzoek naar hogere planten (water- en oeverplanten, macrofyten), algen (kiezelalgen of fyto-benthos, fytoplankton), macrofauna (kleine waterdieren) en vissen. Dit vereist specialisten die voor iedere groep de juiste naam kunnen geven aan de verschillende soorten in hun verschillende stadia (larven, volwassen dieren, sporen): het determineren tot op de soort. Het belang hiervan is dat de kwaliteit van een bepaald type water wordt gekenmerkt door een eigen combinatie van verschillende soorten en hun aantallen: in vervuild water komen andere soorten en aantallen voor dan in schoon, onverstoord water.

Voor een aantal groepen van organismen is de huidige werkwijze voor KRW-monitoring arbeidsintensief en vereist specialistische kennis. Deze handelingen zijn relatief duur en kosten veel tijd. Ook zijn er voor een aantal groepen (te) weinig specialisten om al die honderden soorten vakkundig te determineren. Een goedkope, snelle en betrouwbare methode om deze organismen te determineren zou daarom een goede aanvulling zijn op de huidige methoden.

KRW-MONITORING: IN DE TOEKOMST MET DNA

DNA is 'hot'. Op tv en in de pers zien we regelmatig 'DNA' opduiken, bij de opheldering van misdrijven, of bijvoorbeeld bij het bepalen van de herkomst van microbiële voedselbedervers. Deze voorbeelden geven aan dat DNA-technologie de afgelopen tijd een enorme vlucht heeft genomen. Dat blijkt ook uit het feit dat belangrijke DNA milestones elkaar steeds sneller opvolgen:

- 1869: Ontdekking DNA door Miescher
- 1944 Avery beschrijft DNA als drager erfelijke informatie
- 1953: Watson en Crick beschrijven DNA structuur
- 1975: Sanger beschrijft methode voor bepalen samenstelling DNA (sequencing)
- 1983: Mullis beschrijft methode voor vermeerderen DNA (PCR)
- 1995: Eerste bacteriële genoomsequentie beschikbaar
- 2001: Humane genoomsequentie beschikbaar
- 2006: Nieuwe generatie DNA sequencing technieken beschikbaar (ook gebruikt voor het Hydrochip project)

Die snelle ontwikkeling geldt ook voor de toepassing van DNA-technologie voor het vaststellen van soorten in de biologie. Wereldwijd zijn initiatieven ontstaan voor DNA-barcoding. Dit is een methode die veelal in de taxonomie toegepast wordt, waarbij specifieke stukjes DNA worden gebruikt om vast te stellen tot welke soort een organisme behoort. Ook in Nederland wordt aan dit programma deelgenomen, namelijk door het Naturalis Biodiversity Centre in Leiden.

Met behulp van deze DNA-barcodes is het mogelijk om snel en objectief te kijken naar de soortenrijkdom. Deze technologie kan ook worden ingezet voor KRW-monitoring. Er wordt dan niet meer gekeken naar de uiterlijke verschijningsvorm (de morfologie) om een soortnaam te kunnen toekennen aan een organisme. In plaats daarvan wordt gekeken naar de DNA-barcode.

In het Hydrochip project is een chip gemaakt die relatief snel de belangrijkste soorten kiezelalgen in een watermonster kan identificeren. Hiertoe wordt gebruik gemaakt van de DNA barcodes die overeenkomen met bepaalde indicatorsoorten. Op deze manier wordt een snelle analyse mogelijk gemaakt van de afgeleide waterkwaliteit.

Doel van het Hydrochip project is, om met een eenvoudige, generieke technologie een snelle en routinematige toetsing van de, in oppervlaktewateren aanwezige, indicatorsoorten te kunnen uitvoeren. Daardoor kan de waterkwaliteit sneller in beeld gebracht worden en kan vervolgens beter worden gestuurd op maatregelen om de waterkwaliteit en ecologie in het getoetste oppervlaktewater te verbeteren.

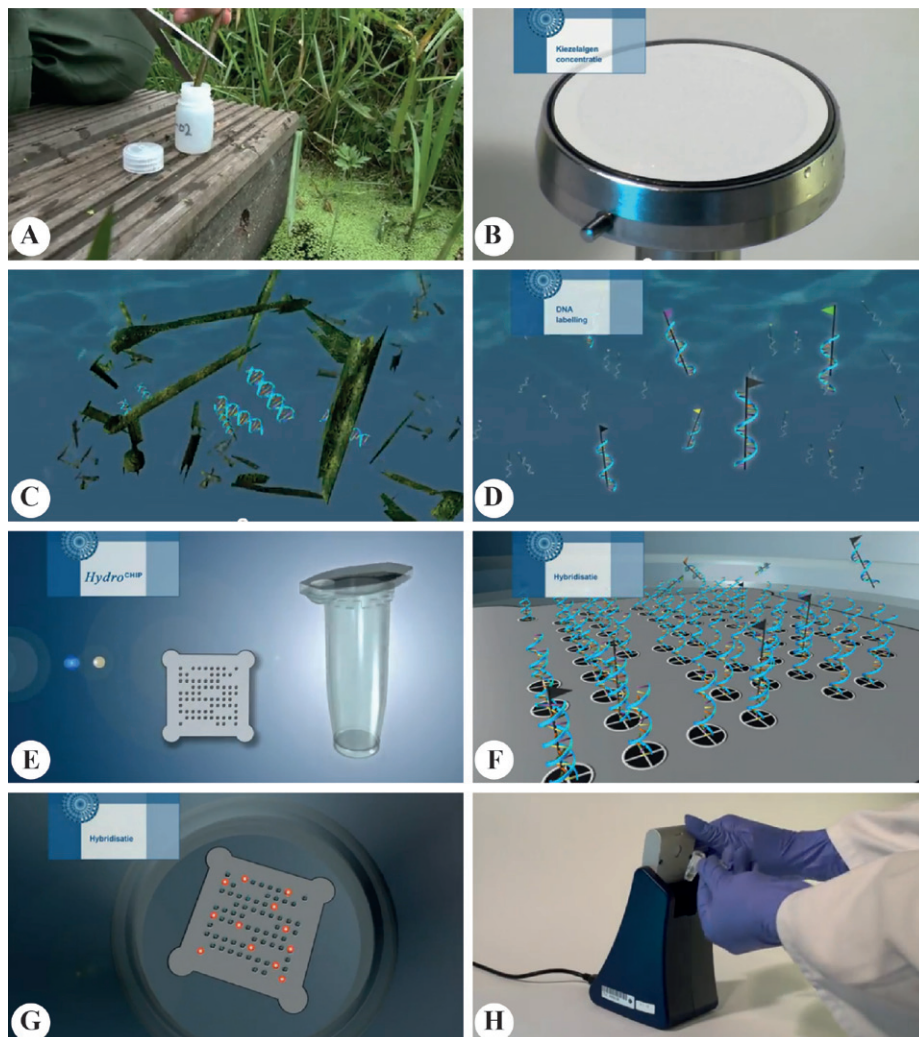
Hoewel een goed werkende Hydrochip een snelle en goede methode moet opleveren voor routinematige analyse van de biologische waterkwaliteit, is het geen simpele vervanging van de huidige meetmethodiek. Het onderzoek naar DNA bij soortidentificatie wordt wereldwijd uitgevoerd en gezien als een belangrijke toevoeging aan de taxonomie [2]. Naar verwachting zal de Hydrochip het belang aanstippen van kennis over de soortenrijkdom en ecologie van planten, dieren en micro-organismen. Immers, een lijst met soorten is de start om informatie te krijgen over de biologische waterkwaliteit. Routinematig werk wordt hiermee eenvoudiger, maar er zal meer vraag komen naar specialisten die kennis hebben over soorten die door de Hydrochip worden aangetoond. Daarnaast kunnen andere belangrijke thema's meer aandacht krijgen: biodiversiteit, ecologie van soorten, kennis over zeldzame en kenmerkende soorten.

2

HOE WERKT DE HYDROCHIP?

Door toepassing van de Hydrochip krijgen waterbeheerders een betrouwbaar beeld van de soortensamenstelling van de kiezelalgenflora in het water. Door de soortensamenstelling, met behulp van geschikte technieken, te interpreteren kan vervolgens een uitspraak gedaan worden over nutriëntenbelasting of trofische status en de ecologische status van het onderzochte water.

AFBEELDING 1 DE VERSCHILLENDE STAPPEN BIJ HET TOEPASSEN VAN DE HYDROCHIP. A. MONSTERNAMES; IN DIT GEVAL EEN RIETSTENGEL VOOR DE ANALYSE VAN PHYTOBENTHOS. B. HET CONCENTREREN VAN KIEZELALGEN DOOR MIDDEL VAN FILTRATIE. C. EXTRACTIE VAN DNA DOOR HET OPENBREKEN VAN KIEZELALGEN GEVOLGD DOOR ISOLATIE VAN HET DNA. D. LABELLEN VAN HET DNA WAARDOOR HET DNA ZICHTBAAR WORDT GEMAAKT (BIJVOORBEELD DOOR KOPPELING MET EEN FLUORESCENTE GROEP). E. SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN DE HYDROCHIP ZALZS DIE ZICH BEVINDT OP DE BODEM VAN EEN PLASTIC REACTIEVAATJE (HOOGTE CA. 4 CM). F. BINDING (HYBRIDISATIE) VAN GELABELD DNA, AFKOMSTIG UIT EEN WATERMONSTER, AAN HET OVEREENKOMSTIGE TARGET-DNA AAN HET OPPERVLAKE VAN DE HYDROCHIP. G. DNA-SPOTS DIE EEN SIGNAAL GEVEN MET DNA DAT GEÏSOLEERD IS UIT EEN WATER- OF RIETSTENGELMONSTER (DIT DUIDT OP AANWEZIGHEID VAN DE BETREFFENDE SOORTEN IN HET MONSTER!). H. CHIP READER VOOR HET UITLEZEN VAN DE HYDROCHIP



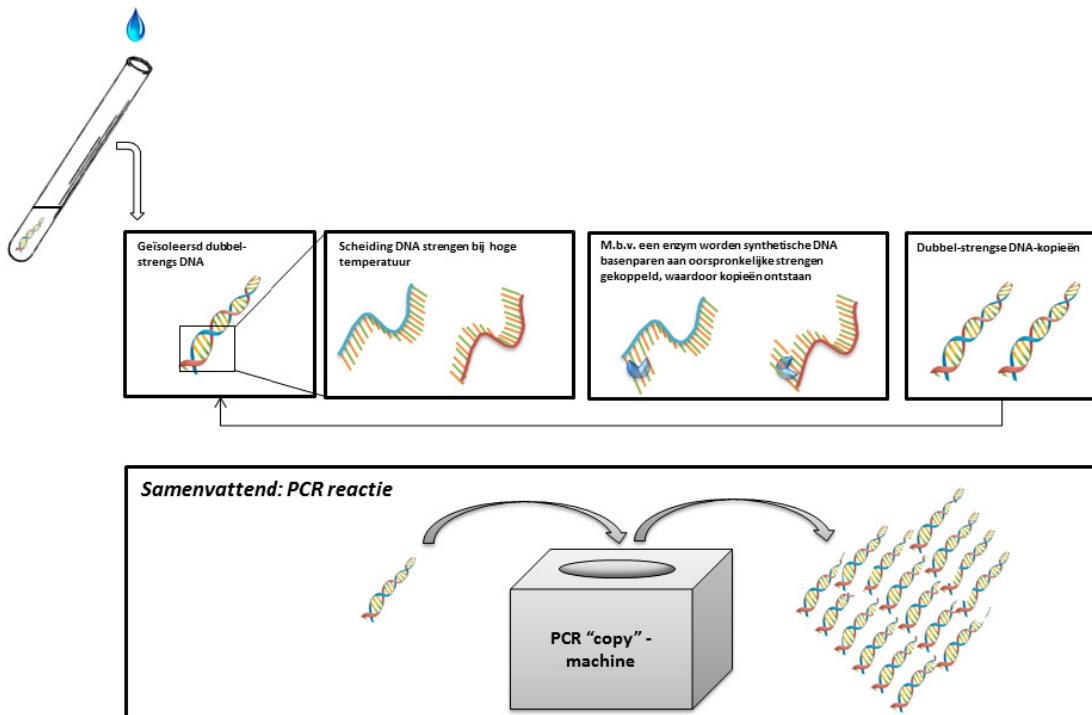
De chip (of microarray) wordt gemaakt door specifieke stukjes DNA (DNA-barcodes, probes of targets) van gekozen algensoorten te 'plakken' op een glasplaatje. Hierdoor ontstaat een patroon van DNA-'spots' op de chip.

Het analyseren van oppervlaktewatermonsters met behulp van de Hydrochip verloopt via een aantal stappen, die zijn samengevat in afbeelding 1. Het principe van de Hydrochip wordt weergegeven in een film. Gebruik de QR-code of kijk op www.stowa.nl bij de digitale versie van dit rapport.



De eerste stap is het nemen van het oppervlaktewatermonster (afbeelding 1A). Dit monster wordt vervolgens gefiltreerd (afbeelding 1B) waardoor alle (eventueel) aanwezige kiezelalgen worden opgevangen. Na behandeling van het filter is het mogelijk het DNA, afkomstig van de kiezelalgen, te isoleren. Het geïsoleerde DNA wordt daarna vermeerderd ('geamplificeerd') in een zogenaamde PCR-stap (PCR staat voor polymerase chain reaction; afbeelding 2).

AFBEELDING 2 PRINCIPE VAN DE PCR-STAP OM DNA TOT GROTE HOEVEELHEDEN TE VERMEERDEREN



Na deze vermeerderingsstap wordt het DNA voorzien van een fluorescente chemische groep ('labeling') voor latere detectie (afbeelding 1C, D) en vervolgens in contact gebracht met de Hydrochip (afbeelding 1E). Hierna vindt de hybridisatiestap plaats: de soort-specifieke stukjes DNA van kiezelalgen binden zich aan het overeenkomstige target-DNA van de Hydrochip. (afbeelding 1F, G).

DNA van soort A zal binden aan het spot waarop zich het target-DNA van soort A bevindt, DNA van soort B zal binden aan het target-DNA van B, etc. Op deze manier ontstaat een patroon van spots die 'aan' (binding: soort aanwezig) en 'uit' staan (geen binding: soort afwezig). Om dit patroon waar te kunnen nemen, wordt met een chip reader (afbeelding 1H) een foto van de Hydrochip gemaakt, die dus aangeeft welke diatomeeën aanwezig zijn in het onderzochte oppervlaktewatermonster.

In de laatste stap wordt het patroon vertaald naar een telling. Een telling die nu gebaseerd is op soortenidentificatie op basis van DNA, in plaats van de morfologie van het kiezelalgenskeletje. Deze telling wordt vervolgens vertaald in een eutrofiëgraad met behulp van de methodieken zoals die beschreven zijn in het Handboek Hydrobiologie [1].

3

ONTWIKKELING HYDROCHIP

ACHTERGROND

De oorsprong van de biologie ligt in het observeren en beschrijven van soorten op basis van morfologische verschillen. Ook de huidige beoordeling van de ecologische kwaliteit van oppervlaktewater is gebaseerd op het voorkomen en de aantallen van soorten en soortgroepen. De verschillende soorten, waaronder kiezelalgen, worden gebruikt als indicatororganismen voor veranderingen in de kwaliteit van het water. De microscopische analyses, waarmee op dit moment kiezelalgenpopulaties worden onderzocht, hebben echter een aantal beperkingen. Zo is er veel ervaring nodig om goed het onderscheid te kunnen maken tussen verschillende soorten, kosten deze analyses veel tijd en is de variatie in analyseresultaten van verschillende experts in veel gevallen een punt van discussie. Door technische ontwikkelingen van de afgelopen jaren zijn er nu alternatieve analysemethoden binnen bereik gekomen. Zo heeft er een enorme ontwikkeling plaatsgevonden op het terrein van DNA-gebaseerde analyses. DNA is de drager van erfelijke informatie en is aanwezig in alle levende cellen. Bepaalde genen komen in alle levende organismen voor omdat ze een rol spelen in belangrijke levensfuncties (bijvoorbeeld eiwitproductie). De precieze volgorde van de vier DNA-bouwstenen in deze genen, is daarbij een sleutel voor de soort. Dit maakt het mogelijk verwantschap op DNA-niveau in kaart te brengen, maar ook om op een veel bredere schaal biodiversiteit in kaart te brengen. Het grote voordeel van DNA-gebaseerde analyses boven morfologische analyses is dat parallelle analyse van veel DNA-monsters heel goed mogelijk is, terwijl morfologische analyses per definitie opeenvolgend (dus één voor één) moeten plaatsvinden. Dit betekent dat er met DNA-gebaseerde analyses een geweldige efficiëntieslag gemaakt kan worden, zowel in kosten als qua tijd.

SELECTIE DNA

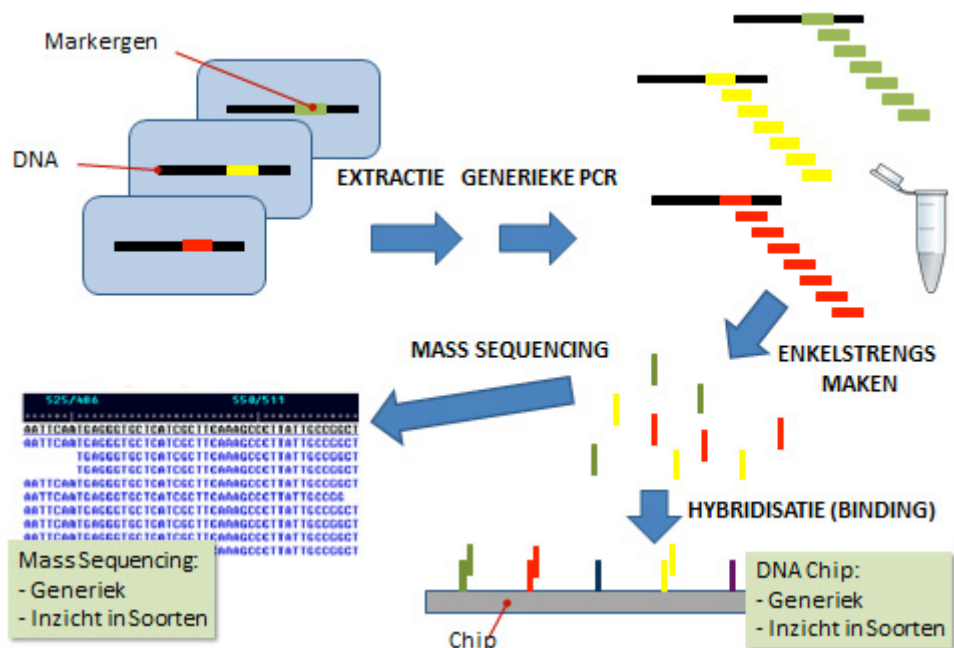
DNA gebaseerde analyses van de biodiversiteit richten zich niet op de volledige analyse van het DNA van een organisme, maar op één specifiek gebied (gen) uit het DNA. Voor de keuze van het specifieke stuk DNA is een aantal factoren van belang:

- Het betreffende stuk DNA moet in alle soorten, die aangetoond moeten worden, aanwezig zijn;
- Het betreffende stuk DNA moet, in soorten die sterk van elkaar afwijken, toch nog redelijk op elkaar lijken om onderlinge vergelijking mogelijk te maken;
- Het betreffende stuk DNA moet daarnaast in soorten die nauw verwant zijn, toch nog voldoende verschillen vertonen om onderscheid mogelijk te maken;
- Van het betreffende stuk DNA is bij voorkeur al behoorlijk wat informatie beschikbaar in vrij toegankelijke databases;
- Het betreffende stuk DNA moet niet alleen in geïsoleerde cellen van 1 soort kunnen worden aangetoond, maar ook in natuurlijk voorkomende populaties van tientallen verschillende soorten.

Voor elk van deze criteria afzonderlijk is het niet zo moeilijk om een stuk DNA te vinden, maar de combinatie van deze criteria maakt het wel lastig. Voor de Hydrochip ontwikkeling is de keus gevallen op het 18S rRNA gen (in het kort 18S gen), omdat dat gen als één van de weinige aan alle criteria voldoet. Andere wetenschappelijke ontwikkelingen richten zich deels op andere genen die echter allemaal beperkingen vertonen voor één of meer van bovenstaande criteria. Om informatie over dit 18S rRNA gen te kunnen verkrijgen, wordt gebruik gemaakt van een techniek die het mogelijk maakt om van een kleine hoeveelheid DNA heel veel kopieën te maken. Hierdoor worden vervolganalyses veel eenvoudiger en gevoeliger. Deze zogenaamde PCR-techniek (zie afbeelding 2) maakt gebruik van twee kleine stukjes DNA (primers), die na binding aan een groter stuk DNA, er voor zorgen dat het gebied tussen de twee kleine stukjes heel snel en efficiënt wordt vermeerderd in een aantal stappen. Voor de ontwikkeling van de Hydrochip is het daarnaast van belang dat die stukjes binden aan het DNA van veel verschillende soorten, waaronder in ieder geval bij alle soorten kiezelalgen. Daarnaast moet het zo zijn dat, in het gebied tussen de twee kleine stukjes DNA, voldoende verschillen aanwezig zijn om verschillende soorten van elkaar te kunnen onderscheiden. Het 18S rRNA gen bleek aan al deze eisen te voldoen en is daarom gebruikt als target DNA voor de Hydrochip.

AFBEELDING 3 PRINCIPE HYDROCHIP. UIT EEN WATERMONSTER WORDT HET DNA VAN KIEZELALGEN GEÏSOLEERD. VERVOLGENS WORDT HET DNA VAN HET 18S GEN (MARKERGEN) VIA EEN PCR-REACTIE VERMEERDERD. IEDERE KIEZELALGENSOORT HEEFT EEN SPECIFIEKE BASENPAARVOLGORDE VAN HET 18S GEN (AANGEGEVEN MET VERSCHILLENDE KLEUREN). TIJDENS DE HYBRIDISATIESTAP ZAL HET VERMEERDERDE DNA BINDEN MET HET OVEREENKOMSTIGE TARGET-DNA OP DE CHIP. HIERDOOR ONTSTAAT EEN PATROON VAN SPOTS DIE 'AAN' (SOORT AANWEZIG, HIER GROEN, GEEL, ROOD) EN 'UIT' (SOORT AFWEZIG, HIER BLAUW EN PAARS) STAAN. HET VERMEERDERDE DNA KAN OOK WORDEN GEBRUIKT OM, VOOR EEN BEPAALD WATERMONSTER, DE BASENPAARVOLGORDE VAN HET 18S GEN TE BEPALEN VOOR DE DAARIN AANWEZIGE KIEZELALGEN

Detectie van Waterorganismen via DNA



Met behulp van de Hydrochip (afbeelding 3) kunnen in één keer een groot aantal verschillende soorten kiezelalgen worden aangetoond. Hiertoe worden synthetische stukjes DNA, die overeenkomen met het target DNA (18S DNA) van verschillende soorten kiezelalgen, afzonderlijk op het oppervlak van een glaasje ge'spot'. Uit praktijkmonsters (aangroei op rietstengels of watermonsters) wordt DNA geïsoleerd. Dit DNA wordt gebruikt als startmateriaal voor het vermeerderen van het stukje DNA dat hoort bij het 18S gen. Op deze manier wordt van dit specifieke gen heel veel DNA gemaakt. Tijdens of na de vermeerderingsstap wordt een label (bijvoorbeeld een fluorescerende stof) ingebouwd om latere herkenning mogelijk te maken. Het gelabelde 18S DNA wordt daarna op het glaasje met de verschillende synthetische stukjes DNA (target DNA) gebracht. Als de DNA-basenpaarvolgordes in het gelabelde en target-DNA hetzelfde is, kunnen ze aan elkaar binden. Hierdoor ontstaan er fluorescerende signalen voor die stukjes DNA, die horen bij de soorten die in het betreffende monster aanwezig zijn. Op die manier ontstaat er een patroon van spots dat laat zien welke soorten wel en welke niet aanwezig zijn in een monster. Essentieel voor het kunnen uitvoeren van de hier beschreven aanpak is wel dat de DNA-volgordes voor de verschillende soorten bekend zijn, omdat zonder die informatie geen synthetisch target DNA kan worden gemaakt. Een groot deel van de ontwikkelingen binnen het Hydrochip project stonden in het teken van het verkrijgen van informatie over deze 18S DNA-volgordes.

BESCHIKBAARHEID TARGET DNA-VOLGORDES

Bij de start van het Hydrochip project is geïnventariseerd hoeveel en welke DNA-volgordes, die het 18S RNA gen representeren, beschikbaar waren voor kiezelalgen. Hoewel dat op het eerste gezicht leek mee te vallen, bleek bij nadere beschouwing dat het aantal beschikbare DNA-volgordes voor zoetwatersoorten heel erg beperkt was. Het was dan ook al snel duidelijk dat zelf actie ondernomen moest worden om de hoeveelheid DNA-volgordes uit te breiden. Er zijn twee verschillende routes gevolgd, een gerichte (gesloten) benadering en een bredere (open) benadering. Voor de gesloten benadering is geprobeerd om specifieke DNA-volgordes te vinden voor specifieke soorten. Bij de open benadering is een grote hoeveelheid DNA-volgordes verzameld, waaruit DNA-volgordes, die horen bij kiezelalgen, zijn geselecteerd. Beide benaderingen zullen hierna in meer detail worden beschreven.

GESLOTEN BENADERING

De gedachte achter de gesloten benadering is dat van specifieke soorten de bijbehorende 18S gen DNA-volgordes kunnen worden bepaald. Op papier klinkt dit heel eenvoudig: Als specifieke kiezelalgensoorten 'rein' voorhanden zijn, dat betekent dat er slechts cellen van één specifieke soort in een monster zitten zonder verontreiniging van andere soorten, dan is het technisch geen probleem om daar DNA-informatie bij te verzamelen. Het grote probleem van die benadering is echter dat levende kiezelalgen niet in zuivere vorm beschikbaar zijn. Alle monsters die al tientallen jaren voor de ecologische monitoring worden verzameld, worden meteen na monsternamen verwerkt op een zodanige wijze dat het DNA niet intact blijft. Bovendien betreft dit ook altijd mengsels van diverse soorten. Deze monsters zijn daardoor niet geschikt voor de gesloten benadering. Een andere route die bijvoorbeeld voor veel groepen planten en insecten wordt gevolgd, is het gebruikmaken van materiaal dat door hobbyisten wordt verzameld. Helaas bestaat een dergelijk netwerk niet voor kiezelalgen. Een derde meer wetenschappelijke route is het gebruikmaken van zogenaamde stammencollecties waarin wetenschappers hun verzamelde materialen opslaan en dit toegankelijk maken voor collega's. Hoewel deze route voor sommige groepen algen wel wordt gebruikt, is deze route voor kiezelalgen niet in gebruik omdat er geen goede methoden bestaan om levende

kieselalgen langere tijd te bewaren en daarna weer verder te laten groeien. Uiteindelijk bleven er nog twee mogelijkheden over die we verder hebben onderzocht, namelijk zelf kweken en zogenaamde 'single-cell analysis'.

Het routinematig kweken van kieselalgen in het laboratorium, is iets waar maar relatief weinig ervaring mee is opgedaan buiten dit project. De beschikbare kennis is grotendeels gebaseerd op specifieke groepen kieselalgen in het kader van wetenschappelijk onderzoek. In samenwerking met de Universiteit Gent in België is een kweekstelsel opgezet, waarmee specifieke soorten efficiënt konden worden gekweekt. Dit stelsel is ook gebruikt voor het kweken van kieselalgen uit natuurlijke monsters waarin diverse soorten kieselalgen voorkomen. Hoewel dit in principe wel werkte, viel het aantal verkregen kolonies, dit zijn verzamelingen van cellen die uit één cel zijn voortgekomen, tegen, zeker gezien de hoeveelheid werk die nodig was om deze kolonies te verkrijgen. Toen bij nadere analyse ook nog bleek dat bijna alle kolonies behoorden tot dezelfde soort en er op deze manier dus nauwelijks nieuwe informatie werd verkregen, is besloten deze route, niet verder te volgen.

AFBEELDING 4

MICROMANIPULATOR VOOR 'SINGLE-CELL ANALYSIS'



De tweede route die is gevolgd binnen de gesloten benadering is de 'single-cell analysis', waarbij losse cellen van kieselalgen zijn geïsoleerd met een speciale microscoop (afbeelding 4). Hierna wordt DNA uit deze cellen gebruikt voor PCR-vermeerdering van het 18S gen. Omdat er in dit geval heel weinig DNA beschikbaar is als startmateriaal, is de eerste ronde van vermeerdering niet voldoende en wordt dit materiaal gebruikt voor een tweede PCR-ronde van vermeerdering. Op deze manier lukt het wel om voldoende materiaal van het 18S gen in handen te krijgen voor verdere analyse. Bij deze manier van analyseren is het ook noodzakelijk om een soortnaam te koppelen aan de DNA-volgorde. Hiertoe worden de twee schaaltes, die afkomstig zijn van de losse kieselalgcél, na de vermeerderingsreacties weer uit het monster gehaald en klaargemaakt voor determinatie door een kieselalgendeskundige. Alles bij elkaar is dit een technisch zeer uitdagende route die behoorlijk goed bleek te werken. Wel viel de efficiëntie van deze route tegen, omdat er bij elke stap sprake was van een percentage uitvallers, waardoor er in relatief weinig gevallen een volledig resultaat werd verkregen. De belangrijkste oorzaak voor uitval was het feit dat veel van de verkregen DNA-volgorde niet hoorden bij kieselalgen, maar bij andere organismen, met name schimmels.

Hoewel het uitgangsmateriaal in alle gevallen losse kiezelalgcellen leken te zijn, doen deze resultaten vermoeden dat in veel gevallen schimmels (waarschijnlijk schimmelsporen) aan of in kiezelalgen aanwezig waren en dat hun DNA efficiënter vermeerderd werd dan het kiezelalgen-DNA. Hoewel deze route een aantal bruikbare DNA-volgordes heeft opgeleverd, die uiteindelijk ook gebruikt zijn voor de Hydrochip, staat de hoeveelheid werk die hiervoor verricht moet worden niet in verhouding tot de tijdslijn en het beschikbare budget binnen het project. Om die reden is in dit project overgestapt op de open benadering.

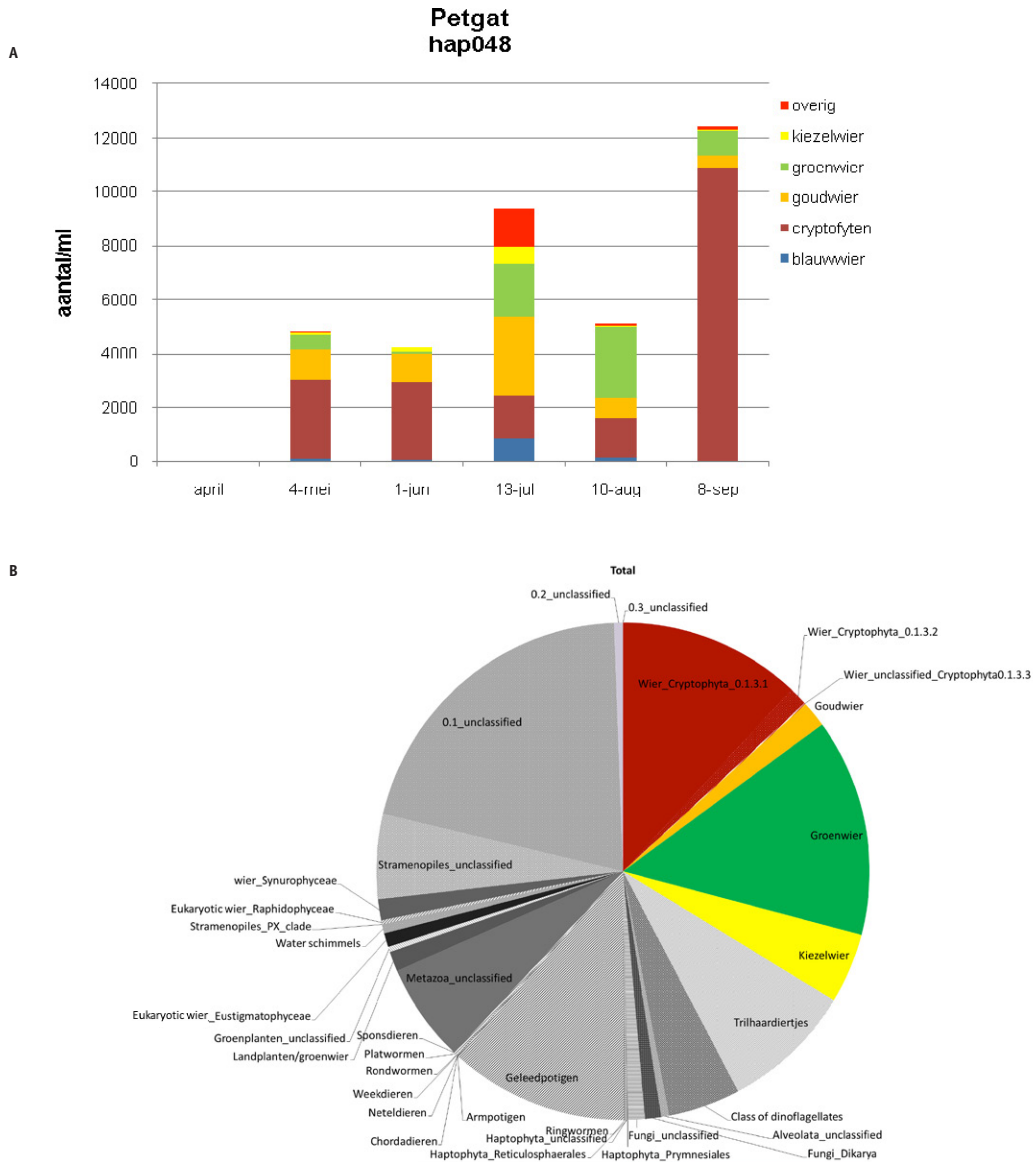
OPEN BENADERING

In tegenstelling tot de gesloten benadering richt de open benadering zich niet specifiek op kiezelalgen, maar veel meer op de in de geselecteerde monsters aanwezige biodiversiteit in bredere zin. Het 18S gen is niet alleen aanwezig in kiezelalgen, maar in alle organismen die een celkern bevatten. Voor de open benadering hebben we gebruik gemaakt van nieuwe technologische ontwikkelingen voor het bepalen van DNA-volgordes, die een uitvloeisel zijn van de wedloop om de samenstelling van het volledige menselijke DNA zo snel en efficiënt mogelijk te bepalen. Deze zogenaamde nieuwe generatie technieken voor het bepalen van DNA-volgordes maken het mogelijk zeer grote aantallen volgordes ineens te bepalen. Het gaat hierbij bijvoorbeeld om 1 miljoen volgordes die niet perse bij één monster hoeven te behoren, maar ook over een groot aantal verschillende monsters kunnen worden verdeeld, bijvoorbeeld 100 monsters met elk 10.000 volgordes. Deze ‘mass sequencing’ techniek is gebruikt om een deel van de monsters, die in het kader van het Hydrochip project zijn verzameld, te analyseren. De resultaten van deze analyses zijn op twee verschillende manieren verder uitgewerkt:

- 1 Specifieke uitwerking van bij kiezelalgen behorende DNA-volgordes;
- 2 Generieke uitwerking van alle DNA-volgordes.

De resultaten van de specifieke, op kiezelalgen gerichte uitwerking, zijn gebruikt voor het toevoegen van nieuwe stukjes target-DNA op de Hydrochip. De generieke uitwerking is gericht op een bredere ecologische analyse van praktijkmonsters en enkele voorbeelden hiervan zullen nader worden uitgewerkt. In dit geval zijn alle verkregen DNA-volgordes vergeleken met een databank, waarin wetenschappers van over de hele wereld hun verkregen DNA-informatie opslaan. Door vergelijking met deze DNA-volgordes en hun bijbehorende informatie was het mogelijk om ook onze nieuwe DNA-volgordes te groeperen en in te delen in zogenaamde taxonomische groepen. Zo zijn in afbeelding 5A de resultaten weergegeven van de fytoplanktontellingen, zoals die door Waternet zijn uitgevoerd voor een specifieke locatie. Hetzelfde monster is samen met een aantal andere monsters ook op DNA-niveau geanalyseerd en de resultaten van die analyse laten zien dat er naast de bekende groepen algen, die zijn geteld door Waternet, nog een groot aantal groepen organismen aangetoond kan worden in deze monsters, op basis van DNA-gebaseerde analyse. Als alle DNA-resultaten van de Waternetmonsters bij elkaar worden genomen (afbeelding 5B) blijkt slechts 30% van de DNA volgordes te behoren tot deze groepen algen. Het is via de open benadering dus mogelijk om veel meer informatie uit deze monsters te halen. Een vergelijkbare analyse is ook uitgevoerd met een deel van de monsters die in het kader van het Hydrochip project zijn verzameld (resultaten niet weergegeven). Uit al deze monsters is DNA geïsoleerd, de DNA-volgordes van de aanwezige 18S genen zijn bepaald en de verkregen resultaten zijn ingedeeld in taxonomische groepen. Als alle informatie van alle monsters bijeen wordt gebracht, wordt een vergelijkbaar taartdiagram verkregen als in afbeelding 5B, waarbij alleen de grootte van de taartpunten varieert, aangezien hier andere praktijkmonsters zijn geanalyseerd.

AFBEELDING 5 VERGELIJKING VAN RESULTATEN VAN EEN FYTOPLANKTONTELLING OP DE CONVENTIONELE WIJZE (A) MET DE NIEUWE DNA-GEBASEERDE ANALYSE (B). AFBEELDING 5A LAAT DE RESULTATEN ZIEN VAN EEN FYTOPLANKTONTELLING VAN LOCATIE HAP048 VAN WATERNET, WAARBIJ DE VERSCHILLENDE KLEUREN DE VERSCHILLENDE GROEPEN ALGEN REPRESENTEREN ZOALS IN HET FIGUUR VERMELD. DEZE ANALYSES ZIJN IN TOTAAL ZES KEER UITGEVOERD GEDURENDE HET JAAR EN DE VERANDERINGEN GEDURENDE HET ZOMERSEIZOEN ZIJN DUIDELIJK ZICHTBAAR. AFBEELDING 5B LAAT DE RESULTATEN ZIEN VAN EEN NIEUWE OP DNA-GEBASEERDE ANALYSE VAN EEN AANTAL MONSTERPUNTEN VAN WATERNET, WAARONDER HAP048. DEZE ANALYSE BEPERKT ZICH NIET TOT ALLEEN FYTOPLANKTON, MAAR LAAT DE GEHELE BIODIVERSITEIT IN DE BETREFFENDE MONSTERS ZIEN. DE KLEURSCHAAL VAN AFBEELDING A IS GEBRUIKT OM DE OVEREENKOMSTIGE GROEPEN ALGEN IN AFBEELDING B WEER TE GEVEN. FYTOPLANKTON DNA-SEQUENTIES MAKEN ONGEVEER 30% VAN DE AANGETROFFEN DNA-SEQUENTIES UIT, DE OVERIGE 70% BETREFT EEN GROOT AANTAL ANDERE ORGANISMEN DIE ZIJN AANGETROFFEN



4

RESULTATEN

VERGELIJKING RESULTATEN MICROSCOPISCHE KIEZELALGENTELLINGEN EN HYDROCHIP

Om de toegevoegde waarde van de Hydrochip beter te kunnen beoordelen, is het belangrijk om een vergelijking te maken tussen de resultaten, die voor een zelfde set van praktijkmonsters worden verkregen, via conventionele microscopische tellingen en via de Hydrochip. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat dit een beetje het karakter heeft van appels met peren vergelijken, omdat beide analysemethoden verschillende facetten van kiezelalgen ‘bekijken’. Voor microscopische tellingen worden de schaaltes van de kiezelalgen nauwkeurig bekeken en wordt door een expert een naam toegekend aan het schaalte. Hiertoe zijn soortenlijsten beschikbaar waarop duizenden namen van kiezelalgen voorkomen. De Hydrochip-analyse is gebaseerd op specifieke stukjes DNA die per soort verschillend zijn. Zoals in het hoofdstuk over de ontwikkeling van de Hydrochip al is beschreven, is slechts voor een beperkt aantal kiezelalgen dergelijke DNA-informatie beschikbaar. Ook is er veel discussie over naamgeving, die regelmatig verandert, en over kiezelalgen die er qua schaalte hetzelfde uitzien, maar op DNA-niveau toch duidelijk verschillend zijn. Hier betreft het dus waarschijnlijk verschillende soorten. Andersom kunnen kiezelalgen er qua schaalte verschillend uitzien, maar op DNA-niveau identiek zijn. Het moge duidelijk zijn dat soortenlijsten, die gegenereerd zijn via de microscopische methode en via de Hydrochipmethode, niet direct met elkaar te vergelijken zijn. We hebben daarom ook gekozen voor een vergelijking van resultaten op een hoger niveau, namelijk habitat of ecosysteem. Hieronder worden de resultaten van de gemaakte vergelijkingen stap voor stap besproken.

In een eerste serie tests zijn in totaal 188 water- en substraatmonsters (rietstengels of andere waterplanten) geanalyseerd op de samenstelling van de kiezelalgen met behulp van 1) microscopie en 2) de Hydrochip. Van elk monster zijn via beide methoden soortenlijsten van de aangetroffen kiezelalgen gegenereerd. Op basis van deze soortenlijsten werd vervolgens een typering van het habitatkenmerk ‘trofiegraad’ uitgevoerd om de kwaliteit van de Hydrochip te toetsen.

In de volgende paragraaf wordt een vergelijking gemaakt tussen de resultaten van de microscopische analyse en de Hydrochip. Vergeleken worden allereerst de soortenlijsten, en ten tweede de resultaten van de typering van het habitatkenmerk trofiegraad.

SOORTENLIJSTEN

De Hydrochip omvat tegenwoordig 74 soorten (tabel 1). De target 18S DNA-stukjes van deze soorten zijn verkregen door eigen resultaten, behaald door middel van de ‘single cell’ aanpak en database gegevens. Alle binnen dit project geanalyseerde monsters zijn met de 75 soorten bevattende Hydrochip getoetst. Deze soorten behoren tot de 150 meest in Nederlandse zoetwateren voorkomende soorten.

Afbeeldingen 6 en 7 geven twee soortenlijsten weer, die opgesteld zijn op basis van de microscopische kiezelalgenanalyse en de Hydrochip-analyse van een draadwiermonster uit de Tetwijkse Wetering. Meteen valt op dat de microscopische analyse veel meer soorten oplevert dan de Hydrochip-analyse. Oorzaak hiervoor is dat de genetische fingerprint van de ca. 2500 in Nederland voorkomende kiezelalgensoorten [3] nog lang niet ontcijferd is. Hierdoor zal een deel van de in de microscopische analyse aangetroffen kiezelalgensoorten door de Hydrochip (nog) niet herkend worden. Sommige frequent voorkomende soorten in het onderzochte monster, zoals *Achnantheidium minutissimum* en *Nitzschia acicularis*, worden echter wel door de Hydrochip, zowel kwalitatief als kwantitatief, goed waargenomen. Verder toont een vergelijking van beide lijsten aan dat de Hydrochip soorten waarneemt die in de microscopische analyse niet geïdentificeerd worden. In het genoemde voorbeeld zijn dit bijvoorbeeld *Achnanthes brevipes* en *Pinnularia microstauron*. *Achnanthes brevipes* is een brak- en zoutwatersoort die in het onderzochte monster eigenlijk niet aangetroffen kan worden. De reden dat deze soort met de Hydrochip toch wordt waargenomen, houdt verband met de gevolgde aanpak bij de open benadering. Hierbij wordt aan een in het monster aangetroffen gensequentie een soortnaam toebedeeld op basis van de meest vergelijkbare sequentie in een bestaande database.

Deze verschillen tonen aan dat op dit moment de Hydrochipresultaten nog getoetst moeten worden aan de uitkomsten van de klassieke microscopische analyse.

TABEL 1 KIEZELALGSOORTEN DIE OP DIT MOMENT MET DE HYDROCHIP GEDETECTEERD KUNNEN WORDEN

<i>Achnanthydium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	<i>Navicula gregaria</i> Donkin
<i>Amphora pediculus</i> (Kützing) Grunow	<i>Navicula lanceolata</i> (C. Agardh) Ehrenberg
<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehrenberg) Simonsen	<i>Navicula phyllepta</i> Kützing
<i>Bacillaria paxillifer</i> (O.F. Müller) Hendey	<i>Navicula radiosa</i> Kützing
<i>Cocconeis pediculus</i> Ehrenberg	<i>Navicula slesvicensis</i> Grunow
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg	<i>Navicula tripunctata</i> (O.F. Müller) Bory
<i>Cyclostephanos invisitatus</i> (M.H. Hohn et Hellerman) E.C. Therot, Stoermer et Håkansson	<i>Navicula veneta</i> Kützing
<i>Cyclotella atomus</i> Hustedt	<i>Nitzschia acicularis</i> (Kützing) W. Smith
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	<i>Nitzschia amphibia</i> Grunow
<i>Diatoma tenue</i> C. Agardh	<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	<i>Nitzschia fonticola</i> Grunow
<i>Discostella pseudostelligera</i> (Hustedt) Houk et Klee	<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow
<i>Encyonema minutum</i> (Hilse) D.G. Mann	<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith
<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G. Mann	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith
<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot	<i>Nitzschia paleacea</i> (Grunow) Grunow
<i>Eolimna subminuscule</i> (Manguin) Moser, Lange-Bertalot et Metzeltin	<i>Nitzschia paleaeformis</i> Hustedt
<i>Ephemia sorex</i> Kützing	<i>Nitzschia supralitorea</i> Lange-Bertalot
<i>Eunotia bilunaris</i> (Ehrenberg) Schaarschmidt	<i>Pinnularia gibba</i> Ehrenberg
<i>Eunotia formica</i> Ehrenberg	<i>Pinnularia microstauron</i> (Ehrenberg) Cleve
<i>Eunotia implicata</i> Nörpel-Schempp, Alles et Lange-Bertalot	<i>Pinnularia subcapitata</i> Gregory
<i>Eunotia pectinalis</i> (Kützing) Rabenhorst	<i>Pinnularia viridis</i> (Nitzsch) Ehrenberg
<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières	<i>Placoneis anglica</i> (Ralfs) Cox
<i>Fragilaria mesolepta</i> Rabenhorst	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot
<i>Fragilaria rumpens</i> (Kützing) G.W.F. Carlson	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot
<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B. Petersen	<i>Sellaphora pupula</i> (Kützing) Mereschkowski
<i>Gomphonema acuminatum</i> Ehrenberg	<i>Sellaphora seminulum</i> (Grunow) D.G. Mann
<i>Gomphonema angustatum</i> (Kützing) Rabenhorst	<i>Stauroneis kriegeri</i> Patrick
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	<i>Staurosira construens</i> Ehrenberg
<i>Gomphonema parvulum</i> f. <i>saprophilum</i> Lange-Bertalot et Reichardt	<i>Staurosirella pinnata</i> (Ehrenberg) D.M. Williams et Round
<i>Gomphonema truncatum</i> Ehrenberg	<i>Stephanodiscus hantzschii</i> Grunow
<i>Halamphora coffeaeformis</i> (C. Agardh) Levkov	<i>Surirella brebissonii</i> Krammer et Lange-Bertalot
<i>Hippodonta capitata</i> (Ehrenberg) Lange-Bertalot, Metzeltin et Witkowski	<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kützing
<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot	<i>Tabularia tabulata</i> (C. Agardh) D.M. Williams et Round
<i>Melosira varians</i> C. Agardh	<i>Thalassiosira pseudonana</i> Hasle et Heimdal
<i>Navicula capitatoradiata</i> Germain	<i>Ulnaria acus</i> (Kützing) Aboal
<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing	<i>Ulnaria biceps</i> (Kützing) Compère
<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère

AFBEELDING 6

TYPING VAN DE TROFIEGRAAD OP BASIS VAN EEN DRAADWIJERMONSTER UIT DE TETWIJKSE WETERING VERZAMELD OP 27 APRIL 2010. IN TOTAAL WERDEN 200 KIEZELALGENSCHAALTJES, DOOR MIDDEL VAN EEN MICROSCOPISCHE ANALYSE, GETELD EN GECLASSIFICEERD. DE BEREKENDE INDICATIEWAARDE VAN 5,1 BETEKENT EEN EUTROFE KIEZELALGENGEMEENSCHAP EN EEN EUTROOF HABITAT (ZIE [1] VOOR DE KLASSE-INDELING VAN TROFIEGRAAD). T = ECOLOGISCHE INDICATIEWAARDE VOOR TROFIEGRAAD UIT [4]. N.B. = VOOR DEZE TAXA ZIJN GEEN INDICATIEWAARDEN BESCHIKBAAR. INDIFFERENTE SOORTEN (T = 7) TELLEN NIET MEE IN DE BEREKENING

Microscopische kiezelalgenanalyse				
Taxon	Aantal schaalpjes	% schaalpjes	T (trofiegraad)	T x %
<i>Achnanthydium minutissimum</i>	29	14,5	7	
<i>Cratcula accomoda</i>	1	0,5	6	3,0
<i>Fragilaria capucina</i>	4	2,0	3	6,0
<i>Fragilaria mesolepta</i>	2	1,0	n.b.	
<i>Fragilaria tenera</i>	1	0,5	2	1,0
<i>Gomphonema parvulum</i>	14	7,0	5	35,0
<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i>	7	3,5	5	17,5
<i>Melosira varians</i>	2	1,0	5	5,0
<i>Navicula cryptotenella</i>	4	2,0	7	
<i>Navicula radiosa</i>	4	2,0	4	8,0
<i>Navicula</i> indet.	2	1,0	n.b.	
<i>Navicula veneta</i>	4	2,0	5	10,0
<i>Nitzschia acicularis</i>	34	17,0	5	85,0
<i>Nitzschia dissipata</i>	2	1,0	4	4,0
<i>Nitzschia palea</i>	46	23,0	6	138,0
<i>Nitzschia perminuta</i>	4	2,0	2	4,0
<i>Planothidium lanceolatum</i>	15	7,5	5	37,5
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i>	1	0,5	5	2,5
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	2	1,0	6	6,0
<i>Stephanodiscus parvus</i>	1	0,5	6	3,0
<i>Tabularia fasciculata</i>	10	5,0	5	25,0
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	2	1,0	6	6,0
<i>Ulnaria acus</i>	2	1,0	5	5,0
<i>Ulnaria ulna</i>	7	3,5	7	
Subtotaal indicatorsoorten (T: 1-6)		78,0		401,5
Subtotaal indicatorsoorten (T: 7)		22,0		
Indicatiewaarde trofiegraad		401,5 / 78,0		5,1
				eutroof habitat

AFBEELDING 7

TYPING VAN DE TROFIEGRAAD OP BASIS VAN EEN DRAADWIJERMONSTER UIT DE TETWIJKSE WETERING VERZAMELD OP 27 APRIL 2010. DE KIEZELALGENSOORTEN WERDEN DOOR MIDDEL VAN EEN HYDROCHIP-ANALYSE BEPAALD. DE BEREKENDE INDICATIEWAARDE VAN 4,8 BETEKENT EEN EUTROFE KIEZELALGENGEMEENSCHAP EN EEN EUTROOF HABITAT (ZIE [1] VOOR DE KLASSE-INDELING VAN TROFIEGRAAD). T = ECOLOGISCHE INDICATIEWAARDE VOOR TROFIEGRAAD UIT [4]. N.B. = VOOR DEZE TAXA ZIJN GEEN INDICATIEWAARDEN BESCHIKBAAR. INDIFFERENTE SOORTEN (T = 7) TELLEN NIET MEE IN DE BEREKENING

Hydrochip kiezelalgenanalyse				
Taxon	Aantal schaalpjes	% schaalpjes	T (trofiegraad)	T x %
<i>Achnanthes brevipes</i>	59	29,5	n.b.	
<i>Achnanthydium minutissimum</i>	19	9,5	7	
<i>Cymbella lanceolata</i>	29	14,5	7	
<i>Fragilaria capucina</i>	16	8,0	3	24,0
<i>Nitzschia acicularis</i>	43	21,5	5	107,5
<i>Nitzschia palea</i>	14	7,0	6	42,0
<i>Pinnularia microstauron</i>	20	10,0	7	
Subtotaal indicatorsoorten (T: 1-6)		36,5		173,5
Subtotaal indicatorsoorten (T: 7)		63,5		
Indicatiewaarde trofiegraad		401,5 / 78,0		5,1
				eutroof habitat

HABITAT TYPERING

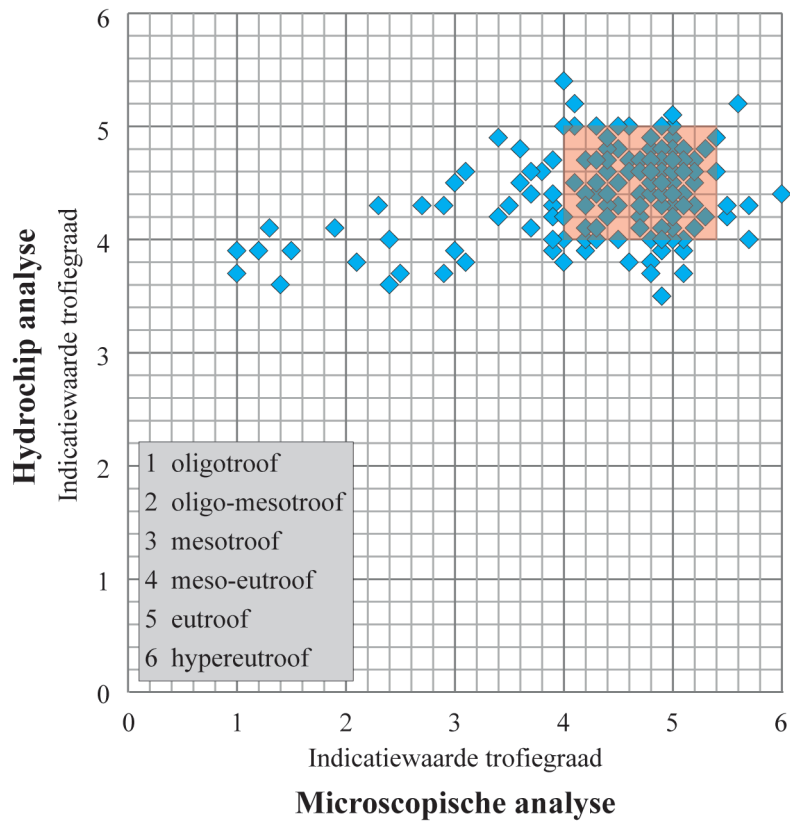
Binnen het waterbeheer wordt veelvuldig gebruik gemaakt van habitatkenmerken als zuurgraad en trofiegraad. Hierdoor kan, op basis van de kiezelalgen-gemeenschap in water- en substraatmonsters, een uitspraak gedaan worden over de kwaliteit van de herkomstwateren. De kiezelalgen-gemeenschap kan bijvoorbeeld aantonen of het herkomstwater van het betreffende monster in oligotrofe, mesotrofe of eutrofe toestand verkeerd. De methode van habitattypering is gedetailleerd beschreven in Handboek Hydrobiologie [1].

In het Hydrochip project zijn typering gedaan voor het habitatkenmerk trofiegraad. Hiervoor krijgt elke kiezelalgensoort een ecologisch indicatiegetal tussen 1 en 7 voor trofiegraad, die afgeleid is uit literatuuropgaven en deskundigenoordelen [1]. In Nederland wordt de lijst van indicatiegetallen zoals beschreven door van Dam [4] het meest toegepast. Afbeeldingen 6 en 7 geven een voorbeeld van de typering van de trofiegraad van het eerder genoemd draadwiermonster. Hoewel er duidelijke verschillen zijn in zowel het aantal geïdentificeerde soorten als de soortsaamenstelling tussen beide analysemethodes, wijst de berekende typering van de trofiegraad op een eutrofe kiezelalgen-gemeenschap en een eutroof habitat.

In het kader van dit project zijn tot nu toe 188 monsters zowel microscopisch als met de Hydrochip op kiezelalgen geanalyseerd, en is voor alle monsters een typering van de trofiegraad uitgevoerd. Afbeelding 8 toont een vergelijking van de indicatiewaarden voor trofiegraad van de microscopische en Hydrochip-analyse voor elk monster. De vergelijking geeft dus aan in hoeverre de berekende trofiegraden door middel van microscopische en Hydrochip-analyse overeenkomen. Het wordt duidelijk dat de Hydrochip in het mesotrofe en eutrofe bereik resultaten levert (licht rode veld in afbeelding 8) die redelijk goed door de microscopische analyse bevestigd worden. Anderzijds is het ook duidelijk dat vooral in het oligotrofe en oligo-mesotrofe spectrum weinig overeenstemming is tussen beide methoden. Dit ligt zeker aan het feit dat er tot nu toe nauwelijks target-DNA stukjes van oligotrofe indicatorsoorten op de Hydrochip geplaatst zijn. De reden is dat de 18S genen behorend bij oligotrofe soorten nog niet bekend zijn.

De resultaten voor het (meso)eutrofe bereik laten zien dat Hydrochip- en microscopische analyses op habitatniveau vergelijkbare uitkomsten laten zien. Verwacht wordt dat dit zal gelden voor het oligotrofe en oligo-mesotrofe bereik, als de moleculaire informatie van de voor deze habitats representatieve soorten aan de Hydrochip kan worden toegevoegd.

AFBEELDING 8 TYPING VAN DE TROFIEGRAAD VAN HERKOMSTWATEREN OP BASIS VAN KIEZELALGENANALYSES VAN 188 ONDERZOCHE WATER- EN SUBSTRAATMONSTERS. DE KIEZELALGEN IN ALLE MONSTERS WERDEN MET ZOWEL EEN MICROSCOPISCHE ANALYSE ALS MET DE HYDROCHIP ONDERZOCHT



5

DISCUSSIE

WAT HEEFT HET PROJECT OPGELEVERD?

Dit project had als belangrijkste doel om een Hydrochip te ontwikkelen waarmee het gemakkelijker wordt om kosteneffectief inzicht te krijgen in de ecologische kwaliteit van oppervlaktewater. Het project is erin geslaagd om een werkende versie van de Hydrochip te maken. Hierbij is overigens wel gebleken dat publiek toegankelijke databases slechts ten dele geschikt zijn voor dit werk, omdat de relatie tussen DNA en de microscopische vorm van de diatomeeën vaak ontbreekt. Om de brug te slaan tussen soorten en DNA-sequenties is er ook een werkwijze ontwikkeld om losse cellen van diatomeeën, met behulp van een micromanipulator, onder een microscoop te verzamelen. Na het uitvoeren van de PCR-reactie worden de losse schaaltes van de diatomeeëncel opgespoord, die na een aantal stappen door een expert getypeerd kunnen worden. Hierdoor kan een soortnaam worden gekoppeld aan een specifieke DNA-volgorde, waardoor resultaten van microscopische tellingen uiteindelijk beter te vergelijken zijn met resultaten van Hydrochip-analyses.

De Hydrochip die binnen dit project is ontwikkeld is in staat een goede voorspelling te doen over de trofiegraad voor het (meso)eutrofe bereik. In de nabije toekomst zal bij de verdere ontwikkeling de nadruk gelegd worden op een uitbreiding van de chip met markers voor algensoorten die representatief zijn voor het oligotrofe en oligo-mesotrofe bereik. De inzetbaarheid van de chip kan daarnaast nog vergroot worden door een uitbreiding richting blauwalgen, waarmee in dit project al een begin is gemaakt.

BIJDRAGE AAN DE KADERRICHTLIJN WATER

Om te controleren of de doelen van de KRW in 2015 worden gehaald, moeten alle waterlichamen in de EU gemonitord worden en getoetst worden aan de KRW-maatlatten. Eén van de maatlatten om de EKR (Ecologische kwaliteitsratio) en de effecten van maatregelen te bepalen is de maatlat voor fyto-benthos en fytoplankton. De Hydrochip zou als een snelle, betrouwbare en kosteneffectieve meetmethode kunnen bijdragen aan het monitoren van de beleidsopgave.

Hoewel een goed werkende Hydrochip een snelle en goede methode moet opleveren voor routinematige analyse van de biologische waterkwaliteit, is het geen simpele vervanging van de huidige meetmethodiek. Het onderzoek naar DNA bij soortherkenning wordt wereldwijd uitgevoerd en gezien als belangrijke toevoeging aan de taxonomie. De Hydrochip zal ook belangrijk zijn om meer aandacht te krijgen voor kennis over soorten planten en dieren. Immers, een lijst met soorten is de start om informatie te krijgen over de biologische waterkwaliteit. Routinematig werk wordt hiermee eenvoudiger, maar er zal meer vraag komen naar specialisten die kennis hebben over aangetroffen soorten. Daarnaast kunnen andere belangrijke thema's meer aandacht krijgen: biodiversiteit, ecologie van soorten, kennis over zeldzame en kenmerkende soorten.

6

SLOTOPMERKING

De Hydrochip is een instrument dat de waterbeheerder in staat stelt om op basis van DNA-vingerafdrukken een goed beeld te verkrijgen van de samenstelling van kiezelalgen in oppervlaktewater. Hiermee biedt het een toekomstig alternatief voor het bepalen van de ecologische kwaliteit door middel van microscopische analyses van water- of aangroei-monsters. De Hydrochip die binnen dit project is ontwikkeld, is in staat een goede voorspelling te doen over de trofiegraad binnen het (meso)eutrofe gebied. In de nabije toekomst zal bij de verdere ontwikkeling de nadruk gelegd worden op een uitbreiding van de chip met markers voor algensoorten die representatief zijn voor het oligotrofe en oligo-mesotrofe bereik. De inzetbaarheid van de chip kan daarnaast nog vergroot worden door een uitbreiding richting blauwalgen, waarmee in dit project al een begin is gemaakt.

Op deze manier is in dit project de basis gelegd voor een goedkope en snelle monitoring ten behoeve van effectief beheer in het kader van de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW) en de Zwemwaterrichtlijn.

Het consortium van dit project zal binnen het EU LIFE+ project Hydrochip (start november 2012) binnen vier jaar de Hydrochip verder ontwikkelen en gebruiksklaar maken voor routinematige watercontrolewerkzaamheden.

7

LITERATUUR

- [1] Bijkerk R (red) (2010) Handboek Hydrobiologie. Biologisch onderzoek voor de ecologische beoordeling van Nederlandse zoete en brakke oppervlaktewateren. Rapport 2010 - 28, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Amersfoort.

- [2] Moritz, C., C. Cicero, 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biol* 2(10): e354.

- [3] Van Dam, H. (2010) Kiezelalgen. In: J. Noordijk, R.M.J.C. Kleukers, E.J. van Nieuwerkerken, A.J. van Loon (red.) *De Nederlandse biodiversiteit. Nederlandse Fauna 10*, Nederlands Centrum voor Biodiversiteit Naturalis & European Invertebrate Survey, Leiden, blz. 131-133.

- [4] Van Dam, H., Mertens, A., Sinkeldam, J. (1994) A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28: 117-131.