



WATERORGANISMEN DOELTREFFENDER DETECTEREN MET FORENSISCHE METHODEN

STOWA Ter Info publiceert in deze en komende uitgaven uitgebreidere artikelen over een STOWA-gerelateerd item, waarbij het onderwerp vanuit diverse invalshoeken wordt belicht. In deze editie de aftrap met een onderwerp dat raakt aan het kennisprogramma Watermozaïek en de KRW: Inzet van DNA-technieken voor soorten- en toxische stoffendetectie. Kunnen schepnet en fuik binnenkort naar het watermuseum?

De Grote modderkruiper (A) is *hard to get*. Zodra de streng beschermde vis in de verte de motor of zelfs de peddel van de boot van de waterbeheerder hoort, duikt hij, zoals zijn naam al doet vermoeden, onder in de drabbige bagger van de waterbodem. In opdracht van waterschap Groot Salland zocht ecoloog Jelger Herder in vier polders naar het zeldzame en schuwe visje. ‘Op grond van de moerasachtige vegetatie zou de Grote modderkruiper in de polders kunnen voorkomen, maar de vis was nog nooit gevonden’, vertelt de medewerker van RAVON (Reptielen Amfibieën Vissen Onderzoek Nederland).



*Jelger Herder (RAVON):
‘DNA-analyse kan waterbeheerders helpen om
aan KRW-verplichtingen te voldoen.’*

Herder was niet een hele dag met schepnet, fuik of elektrovisnet in de modder aan het woelen, maar nam watermonsters. ‘We waren hiermee in een minuut of twintig per locatie klaar en stuurden de monsters op naar het gespecialiseerde lab van Spygen in Frankrijk.’ Enkele weken later ploften spectaculaire meetresultaten op de deurmat van de natuurorganisatie die zetelt op de campus van Radboud Universiteit Nijmegen. ‘Op dertien van de in totaal veertig onderzochte locaties bleek de vis aanwezig’, zegt Herder opgetogen.

Environmental DNA heet de nieuwe techniek die sinds 2008 sterk in ontwikkeling is. Er zijn intussen voor veel verschillende soorten primers (zie pagina 9) ontwikkeld met unieke stukjes soortspecifiek DNA. Ook voor de moeilijk te vangen Kamsalamander bestaan intussen DNA-primers en RAVON ontmaskerde de Knoflookpad (B) ermee in leefgebieden in Nederland waarvan gedacht werd dat de soort daar was uitgestorven. Net als de Grote modderkruiper is de Knoflookpad een uiterst lastig te vinden soort, vertelt Herder. ‘In de nacht roept de pad zachtjes onder water, dus ecologen moeten tijdens nachtelijke zoektochten uren met een hydrofoon onder water luisteren.’

Vissoorten als de streng beschermde Beekprik, Rivierprik, Kwabaal en de recent in Nederland geïntroduceerde Atlantische steur lenen zich er alle voor om met de DNA-methode te detecteren. En het blijft niet bij vissen en amfibieën. Herder verhaalt van de lastig te vinden libellensoorten als de Groene glazenmaker (I) en de Gevlekte witsnuitlibel (C) en zoogdieren als Waterspitsmuis (D) en de Noordse woelmuis (F).

Het Franse laboratorium Spygen dat de RAVON-monsters analyseerde, is één van de environmental DNA-pioniers. Het werd in 2011 opgericht als spin-off bedrijf van de Universiteit van Savoie in Grenoble. Spygen ontdekte in 2008 op grond van DNA-analyse dat de Amerikaanse brulikker, een gevreesde exoot, in een Zuidwest-Frans gebied



niet in zeven van de 49 meertjes voorkwam, zoals de klassieke onderzoeksmethode van nachtelijke observaties leerde, maar in 38.

Daardoor konden sneller maatregelen worden genomen tegen deze exoot. 'Wij hoorden medewerkers van Spygen over hun eDNA-methode vertellen op een wetenschappelijk congres in Turkije in de periode dat wij nog louter met schepnet en fuik werkten. We zijn direct op ze af gestapt.'

Behalve een meer secure analyse, lijkt de DNA-methode ook minder tijdrovend en daarmee goedkoper, voor sommige soorten tot wel tweeëneuhalf keer zo snel, aldus Herder.

In het verschiep ligt een methode waarin primers zich richten op het DNA van een hele groep amfibieën of een hele groep vissen. De nu nog peperdure techniek berust op zogeheten next generation sequencing. 'DNA in het watermonster wordt vermenigvuldigd en de amfibiesoorten worden 'ontmaskerd' doordat een apparaat alle DNA-basencodes uitleest. Dat kan een stapel A4tjes van 48 kilometer hoog opleveren. Een zeer krachtige computer, de



Ronald Bijkerk (Koeman en Bijkerk):
'Voor het precies vaststellen van de relatie tussen gevonden hoeveelheden e-DNA en biomassa moet nog veel onderzoek worden verricht.'

sequencer, analyseert deze stapel', zegt Herder. De sequencer met een prijs van 300 duizend euro staat alleen in gespecialiseerde laboratoria. RAVON test de methode in Nederland en verwacht dat de analyse in 2014 toepasbaar zal zijn. 'Het kan waterbeheerders helpen om aan de verplichtingen uit de Kaderrichtlijn Water (KRW) te voldoen.'

KANTTEKENINGEN

Bij het Groningse ecologisch onderzoeksbureau Koeman en Bijkerk deed Ronald Bijkerk ook ervaring op met DNA-detectiemethoden. Waar RAVON zich toelegde op de Grote modderkruiper, koos Bijkerk in samenwerking met het Groningse biotechnologiebedrijf Sylphium Life Sciences voor de moeilijk te vangen Kwabaal (E), een zeldzame kabeljauwachtige vis die zijn hele leven in zoetwater doorbrengt. 'In de Wieden zetten we op drie plaatsen fuiken en rond elke fuik namen we in een straal van dertig meter drie watermonsters. Op de eerste plek troffen we in alle drie de monsters DNA van de Kwabaal aan, op de tweede locatie slechts één keer, en op de derde plek niks.' In de fuiken werd acht weken lang geen enkele Kwabaal gevangen.

Hieruit blijkt dat de eDNA-methode gevoeliger kan zijn dan traditionele methoden. 'Maar er is een bepaalde bemonsteringsinspanning nodig voor betrouwbare resultaten.' Met name als je niet alleen het voorkomen van de soort wil aantonen maar ook uitspraken wilt doen over dichtheden waarin ecologisch relevante organismen voorkomen. 'Zolang we niet precies weten hoe het eDNA zich door het milieu verspreidt en wat de levensduur is, weten we ook niet hoe we negatieve resultaten moeten interpreteren', aldus Bijkerk. 'Het kan zijn dat de soort er dan niet zit. Het kunnen ook vals negatieve uitkomsten zijn, doordat het DNA is afgebroken voor het de bemonsteringsplek heeft bereikt. Grosso modo gaat DNA drie weken mee. Dat hangt vooral van de watertemperatuur af.'

Naast het monsterprotocol en interpretatie van de DNA-analyse plaatst Bijkerk kanttekeningen bij de mogelijkheden van de methode om betrouwbaar te kwantificeren. 'Er zijn wel correlaties gevonden tussen de hoeveelheid eDNA en de hoeveelheid biomassa. Maar stress, watertemperatuur en predatiedruk kunnen deze correlaties veranderen. Het lijkt mij nu nog heel moeilijk om een betrouwbaar beeld te geven', aldus de Groningse ecooloog die de laatste hand legt aan een STOWA-rapport over de mogelijkheden van environmental DNA-methode voor waterbeheer.

Waterbeheerders zijn uiteraard vooral geïnteresseerd in de nieuwe methode vanwege het lonkende perspectief om snel, goedkoop en betrouwbaar de ecologische toestand van hun waterlichamen te bepalen. Volgens Bijkerk is de methode daarvoor echter nog niet genoeg uitgekristalliseerd. 'Eerst moeten we weten hoe eDNA zich verspreidt over wateren, afhankelijk van de vissoort en omstandigheden. Dan kunnen we een optimale bemonsteringsstrategie vaststellen en deze vastleggen in een protocol.'



Miguel Dionisio Pires (Deltares):

'Slechts vijf à tien procent van de totale blauwalgpopulatie is drager van het toxiciteitsgen dat problemen in het water veroorzaakt'

Desondanks vindt de ecooloog dat environmental DNA zeker perspectief heeft. 'Het kan op termijn sneller, goedkoper en met minder stress en dierenleed gepaard gaan dan bij de huidige vangstmethoden. En wellicht is kwantificering voor onze beoordelingen niet altijd nodig. We moeten waterbeheerders op dit moment echter nog geen bovenmatige verwachtingen voorspiegelen voor wat betreft toepassing in de KRW-monitoring', tempert Ronald Bijkerk ongebreideld enthousiasme.

Jelger Herder van RAVON meent dat het meetprotocol op orde is en de DNA-watermonsters niet onderdoen voor de kwaliteit van de conventionele methoden. 'Al is het bepalen van dichtheden soms lastig, vooral voor vissen in open wateren', beaamt hij. Ook om andere redenen meent hij niet dat schepnet, fuik en hydrofoon naar het museum kunnen. 'Heel veel gemakkelijk te vangen soorten vissen en amfibieën, kunnen met een even goede betrouwbaarheid op de klassieke methode worden aangetoond. De meerwaarde zit in lastig te detecteren, zeldzame en streng beschermde soorten', aldus Herder.



Ron van der Oost (Waternet)

'Nu ligt de focus op een maatlat voor kiezelwieren. Als het environmental DNA verder tot bloei komt, kan uibreiding plaatsvinden naar vissen, amfibieën en zeezoogdieren.'

SCHADELIJKE STOFFEN

Waar de environmental DNA methode zich richt op het voorkomen van gewenste en ongewenste soorten, houdt Sander van der Linden van het VU-spinoffbedrijf BDS zich bezig met stoffen die schadelijke effecten op de waterfauna hebben. 'Medicijnresten en hormoonverstorende stoffen kunnen we vaak niet met chemische analyse aantonen. Maar we zijn wel steeds beter in staat om de biologische effecten te detecteren', zegt Van der Linden.

Daartoe beschikt BDS intussen over een twintigtal verschillende biologische testen met receptoren waaraan specifieke hormoonverstorende stoffen hechten. 'Door de test in contact te brengen met watermonsters produceren de cellen licht en weten we welke hormoonverstorende werking in het geding is.'

Iets dergelijks kan BDS voor stoffen die DNA-schade veroorzaken, zoals PAK of dioxines. Het daarbij betrokken eiwit p53 met effecten op de celregulatie is voor de methode cruciaal. 'DNA-schade veroorzaakt door een stof in het water activeert dit signaaleiwit, waardoor het reparatie-terugkoppelmechanisme wordt aangezet', zo duidt Van der Linden de uit het kankeronderzoek afkomstige techniek.

Probleem is dat oppervlaktewaterbeheerders er nog niet goed mee uit de voeten kunnen omdat er nog geen vastgestelde effectgebaseerde normen bestaan voor het water. Bij drinkwaterbedrijven ligt dat anders. 'Daar is meer geld beschikbaar voor analyse en zuivering. Het te beschermen organisme is voor drinkwater namelijk de mens. De risico's moeten dus tot een hoger niveau worden teruggedrongen', aldus Van der Linden.

BLAUWALGEN

Deltares past kwantitatieve PCR toe op blauwalgen. In 2011 hebben Miguel Dionisio Pires en Bas van der Zaan in opdracht van Rijkswaterstaat met genetische detectie in een groot aantal meren en plassen vastgesteld welke geslachten van de blauwalgen aanwezig zijn. 'Vier geslachten blauwalgen komen het meeste voor. Slechts vijf à tien procent van de totale blauwalgpopulatie is drager van het toxiciteitsgen dat problemen in het water veroorzaakt', somt Pires op. 'De conclusie is dat er dus ook toxines worden verspreid door een aantal nu nog onbekende groepen blauwalgen. Meer onderzoek is nodig.'



F

DNA van een achtergelaten haar kan een inbreker tegenwoordig tegen de lamp doen lopen. Net zo registeren slimme tools, gebruik makend van DNA-analyse, welke faunasoorten zich in een water hebben opgehouden. Dit kan straks helpen om de ecologische toestand voor de Kaderrichtlijn Water in kaart te brengen.

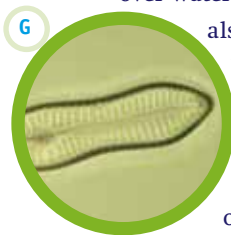
Ook werkt Deltares op basis van de detectie van het specifieke gen dat blauwalgen aanzet tot toxineproductie. ‘Als het DNA van de blauwalgen in het watermonster na vermenigvuldiging in de PCR-machine matcht met het DNA op de primer, licht een fluorescerende stof op’, aldus Dionisio Pires.

Soortgelijke één-op-één detectie vindt plaats op de zogeheten Hydrochip voor kiezelwieren (G). ‘We kunnen nu de 75 belangrijkste soorten van de circa 2000 soorten kiezelwieren (diatomeeën) blootleggen, maar we willen toe naar de 150 soorten’, zegt toxicoloog Ron van der Oost van Waternet in Amsterdam.

Het protocol voor de monsternamen is identiek aan de conventionele methode, maar de voordelen van de hydrochip zijn evident, aldus Van der Oost. ‘Het is niet alleen sneller en goedkoper (100 à 200 euro tegen 900 à 1000 euro per monster), maar er zullen ook steeds minder taxonomische geschoolde analisten zijn die de kunst verstaan om de verschillende kiezelwieren onder de lichtmicroscop te herkennen.’

Van der Oost verwacht dat er op termijn met de techniek een maatlat wordt ontwikkeld voor de ecologische toestand van het fyto-benthos, één van de categorieën waarover waterbeheerders in de KRW moeten rapporteren. ‘En als het environmental DNA verder tot bloei komt kan uitbreiding plaatsvinden naar vissen, amfibieën en zeezoogdieren, dan zal het een breder publiek aanspreken. Kiezelwieren zijn immers niet zo aaibaar. Bij uitbreiding naar grotere organismen kun je laten zien of het goed gaat met de visstand en de hele voedselketen.’

De hydrochip is een samenwerkingsproject (EU-Life-project) van Waternet, TNO, Vitens, HHNK en STOWA.



FACT FINDING MISSIE NAAR OVERTROMINGSGBIED TUSSEN DRESDEN EN MAGDEBURG

In de week van 1-3 juli heeft STOWA geparticipeerd in een fact finding missie naar de Duitse overstromingsgebieden. De missie was opgezet door TUDelft, samen met Technische Universität Dresden, Rijkswaterstaat, Eperitisenetwerk Waterveiligheid (ENW) en STOWA.

Vanuit de STOWA was Joop de Bijl, senior beleidsadviseur bij Waterschap Aa en Maas, mee op pad. Doel is te leren hoe een en ander is aangepakt en dit vast te leggen.

Peter Blommaart (RWS) en Henk van Hemert (namens STOWA) gaan later deze maand voor een geotechnisch falen missie. Na de zomer zal Ludolph Wentholt samen met Mathijs Kok (en anderen) vanuit Governance- en MLV-aspecten het gebied bezoeken. De indrukken van Joop de Bijl zijn weergegeven op pagina 15.

