



Susan Sollie, Tauw
 Jeroen Kluck, Tauw
 Adrie van Hooff, Tauw
 Johannes Helder, Wageningen Universiteit

Nematoden als indicator voor de waterkwaliteit

Het beoordelen van de waterkwaliteit is een lastige zaak. Vaak wordt de chemische kwaliteit bepaald, maar eigenlijk willen we weten welke effecten die heeft op de biologische kwaliteit. Veld- en microscopisch onderzoek aan biologische indicatoren is bewerkelijk en bovendien zijn de resultaten niet eenduidig. Met de ontwikkeling van DNA-analysetechnieken is het mogelijk geworden nematoden in de waterbodem snel en accuraat te analyseren. Nematoden zijn kleine aaltjes (lengte 0,3 tot 1,0 mm) die in grote aantallen en met een aanzienlijke diversiteit in de waterbodem aanwezig zijn. De combinatie van hoge dichtheden en grote verscheidenheid maakt de nematodengemeenschap tot potentiële bio-indicator voor de waterwaterkwaliteit. Een pilot liet zien dat DNA-analyse van nematoden in de waterbodem duidelijke signalen van eutrofiëring aangaf en daarmee inzicht gaf in de waterkwaliteit.

Inzicht in de waterkwaliteit is noodzakelijk (en wenselijk) om situaties te beoordelen en de noodzaak van maatregelen ter verbetering van die waterkwaliteit af te kunnen wegen. Zo verplicht de KRW waterbeheerders de chemische en biologische kwaliteit van oppervlaktewater in waterlichamen te beoordelen. Ook buiten waterlichamen (bijvoorbeeld in stedelijk gebied) dient de waterkwaliteit te voldoen aan gestelde normen.

Maar het beoordelen van waterkwaliteit is een lastige zaak. De chemische kwaliteit is relatief eenvoudig te bepalen, de biologische kwaliteit is lastiger. Chemisch onderzoek zegt bovendien niet alles; het is erg lastig om het gecombineerde effect van meerdere vervuilende stoffen in te schatten. De biologische waterkwaliteit (voorkomen en variatie van soorten) is een gevolg van de fysisch-chemische waterkwaliteit. Het kan zijn dat de chemische waterkwaliteit tijdelijk verslechtert, maar dat dit - afhankelijk van de bio-beschikbaarheid - geen of geen langdurige effecten heeft op de biologie in het watersysteem.

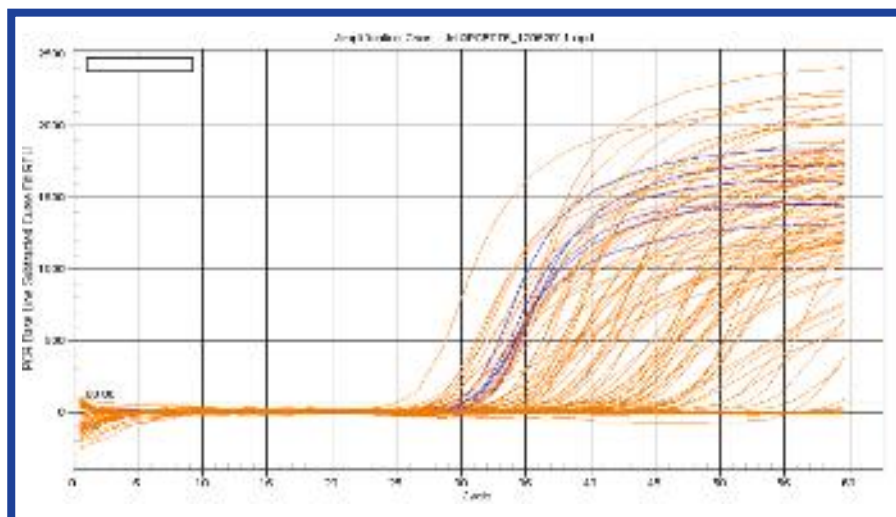
En juist die veerkracht en gevoeligheid van het systeem is een goede indicatie of een systeem 'gezond' is. Het is daarom van belang om een geschikte biologische indicator te vinden die de gezondheid van het systeem op betrouwbare wijze bepaalt.

Wat is er mis met de huidige indicatoren?

De biologische kwaliteit wordt meestal bepaald door het inventariseren en tellen van soorten planten en dieren (vaak met binoculair of microscoop). Dit is over het algemeen een arbeidsintensieve en tijdrovende taak die alleen door specialisten kan worden uitgevoerd. Dit resulteert in minimale bemonstering en analyse van de biologische waterkwaliteit. Daarnaast speelt

er nog iets anders. De huidige biologische indicatoren geven vaak geen goed beeld van de veerkracht. Vissen kunnen wegzwemmen van vervuiling, planten reageren traag op veranderingen in de waterkwaliteit en macrofauna heeft (ten opzicht van nematoden) een lange levenscyclus. Wij denken dat nematoden een aantal zeer positieve eigenschappen hebben om als goede bio-indicator te fungeren voor de waterkwaliteit.

Afb. 1: Uitkomst van PCR, waarbij iedere lijn een andere nematodefamilie representeert. Naarmate de stijgende lijn meer naar links ligt, zit er meer van de betreffende nematode in.



Nematoden als bio-indicator

Nematoden zijn microscopisch kleine wormpjes die in grote hoeveelheden en soortaantallen in de waterbodem voorkomen. Er zijn diverse argumenten om juist deze groep als indicator te gebruiken. Nematoden zijn abundant (tienduizenden individuen per m²), zodat vrij kleine monsters voldoende informatie opleveren om statistisch verantwoorde uitspraken te doen. Daarnaast omvatten nematoden verschillende trofische groepen (bacterivoren, algen-etters, predators en omnivoren), waarmee effecten op alle lagen van het voedselweb kunnen worden gedetecteerd. Nematoden vertonen een breed spectrum aan gevoeligheden voor verstoringen, waarmee gemeten kan worden in een breed scala van stresscondities. Bovendien is de mobiliteit van nematoden in zoetwaterbodems gering, zodat resultaten ook echt het effect weerspiegelen van lokaal aanwezige stressoren. De levenscyclus van nematoden is zo kort, dat er vrijwel direct (= binnen een paar dagen) reacties te zien zijn op vervuiling. Ten slotte zijn nematoden goed onderzocht; dit betekent dat geconstateerde veranderingen in de meeste gevallen ecologisch verklaard kunnen worden.

De afgelopen jaren heeft het Laboratorium voor Nematologie (Wageningen Universiteit) een ribosomaal DNA-databank gegenereerd die vrijwel alle in Nederland voorkomende nematodengenera omvat (in totaal nu ongeveer 2.500 soorten)¹⁾. Daarmee is het mogelijk geworden middels DNA-barcoding nematodenfamilies en aantallen per familie in de bodem te bepalen. Het grote voordeel hiervan is dat een tijdrovende bezigheid vervangen is door een efficiënte, snelle en betrouwbare methode om nematoden te inventariseren. Deze methodiek wordt al breed toegepast voor de analyse van grondmonsters²⁾. De toepassing voor waterbodems is nieuw, maar het functioneren van de DNA-barcoding staat (als bewezen techniek) hier niet ter discussie.

Het onderzoek

In het najaar van 2011 hebben we een pilot-project uitgevoerd om te onderzoeken of nematoden een goede indicator voor de waterkwaliteit kunnen zijn én of DNA-barcoding een werkbare methode is voor waterbodems³⁾. In het beheergebied van drie waterschappen (Veluwe, De Dommel en Velt en Vecht) en twee gemeenten (Bergen (NH) en Oisterwijk) zijn bemonsteringen uitgevoerd op locaties waarvan bekend was dat ze vervuild waren door een overstort. Ter controle zijn ook bovenstrooms monsters genomen. Voor bemonstering van de bovenste vijf centimeter van de waterbodem is een Uwitex sedimentboor gebruikt. Uit deze waterbodemmonsters zijn de nematoden geëxtraheerd. Deze nematoden zijn vervolgens zowel microscopisch als middels DNA-barcoding gedetermineerd en geteld (tot familieniveau). De microscopische analyse gaf hetzelfde beeld te zien als de DNA-barcoding. Van te voren hadden we een groep samengesteld van de meest voorkomende nematoden-



Nematode van de familie *Tobriilidae*.

families in zoetwatersystemen. Het betreft 18 families, een praktisch bruikbaar aantal waarbij verschillende voedingstypen en verschillende mate van stresstolerantie zijn opgenomen. Kwantitatieve testen voor deze families zijn ontwikkeld in een Genes4Water-project⁴⁾.

Veelbelovende resultaten

De resultaten van deze pilot wijzen erop dat nematoden en DNA-barcoding de potentie hebben om als indicator voor de waterkwaliteit te dienen. In de waterbodemmonsters waren nematodenfamilies aanwezig die zowel op de vervuilde als op de controlelocaties voorkwamen. Daarnaast waren er enkele kenmerkende soorten die alleen op één van beide locaties zijn aangetroffen. Op elke locatie vonden wij minimaal zes verschillende families. In totaal zijn elf verschillende families aangetroffen. Deze pilot was te klein opgezet om significante verschillen aan te tonen (daarvoor zouden meer herhalingen nodig zijn), maar wanneer een familie binnen één watersysteem op de ene locatie wel aanwezig is en op de

andere locatie totaal afwezig is, is dit wel een duidelijk signaal. Omdat dit type resultaten de meeste informatie geven, bespreken we alleen de zogenaamde 'kenmerkende families' (families die alleen op één locatie voorkomen) (zie tabel).

In Klijndijk zijn op de controle locatie de bacterivoren *Monhysteridae* en *Plectidae* gevonden, terwijl op de vervuilde locatie juist de bacterivoor *Alaimidae* is gevonden (naast overeenkomende families). *Monhysteridae* en - in mindere mate - *Plectidae* zijn zeer veel voorkomende zoetwater nematoden. In literatuur geldt een algemeen beeld dat *Monhysteridae* aantallen afnemen naarmate eutrofiëring toeneemt. Het volledig afwezig zijn van deze groep in de vervuilde (sterk geëutrofiëerde) locatie Klijndijk was echter onverwacht en opmerkelijk. We hebben dit beeld op geen enkele andere vervuilde locatie aangetroffen. De familie *Alaimidae* (bacterie-etters) zijn aanwezig in de sterk geëutrofiëerde locatie in Klijndijk en niet op de controlelocatie. De aanwezigheid van deze groep duidt op

Kenmerkende nematodenfamilies zoals die naar voren komen uit een experiment dat is uitgevoerd in november en december 2011 op vijf zoetwaterlocaties in Nederland. De locaties voor Oisterwijk ontbreken hier. Door de lage extractie-efficiëntie konden we daar geen volledige analyse uitvoeren.

locatie	controlelocatie	vervuilde locatie
Klijndijk	<i>Monhysteridae, Plectidae</i>	<i>Alaimidae</i>
Veluwe	-	<i>Tobriilidae</i>
Geldrop	-	<i>Tobriilidae</i>
Bergen (NH)	-	<i>Tripylidae</i>

hoge bacteriële dichtheden. Anders dan in terrestrische systemen is over de ecologie van deze groep in zoetwatermilieus nog weinig bekend.

Voor de locaties op de Veluwe en in Geldrop zijn de *Tobrilidae* van belang: deze familie is wel op de vervuilde locaties en niet op controlelocaties aangetroffen. *Tobrilidae* is een familie die een aanzienlijk aantal geslachten omvat waaronder *Tobrilus*, *Epitobrilus*, *Semitobrilus* en *Eutobrilus*. Ecologisch gezien lijken de geslachten veel op elkaar. In deze studie zijn ze als groep gedetecteerd.

In het algemeen is deze familie kenmerkend voor onvervuilde locaties, met een opmerkelijke uitzondering: *Tobrilus diversipapillatus*^{5),6)}. Het is om deze reden zeer wel mogelijk dat het specifieke signaal dat in De Dommel bij Geldrop en in Epe (Veluwe) gemeten is - *Tobrilidae* op de vervuilde locatie - veroorzaakt is door deze ene soort, *Tobrilus diversipapillatus*. In deze pilot is echter niet op soort gedetermineerd. Dit zou interessant zijn voor een vervolgstudie.

In het zeer ondiepe stroompje in Bergen vonden wij de familie *Tripylidae* op de vervuilde locatie, terwijl deze op de controlelocatie ontbrak. Soorten van deze familie komen zowel terrestrisch, aquatisch als in brakwatersystemen voor. In literatuur is, voor zover we hebben kunnen nagaan, nog niet eerder een specifieke toename van *Tripylidae* als gevolg van eutrofiëring beschreven. Waarschijnlijk betreft het hier een andere oorzaak.

Concluderend is in Klijndijk een duidelijke relatie te leggen tussen eutrofiëring en de aanwezige nematoden. Voor de andere locaties zien we duidelijk verschillen in nematoden tussen de vervuilde en controlelocatie. Hoe we deze moeten duiden is nog niet bekend. Nader onderzoek dient uit te wijzen door welk type vervuiling het voorkomen (of juist afwezigheid) van families veroorzaakt wordt, of dit algemeen geldig is, veel voorkomt of juist soms wordt tegengesproken.

DNA-barcoding werkt

De gevolgde methoden voor het bemonsteren, het extraheren van de monsters en de analyse van aanwezige families middels DNA-barcoding bleek in deze pilot zeer goed te werken. Na in eerste instantie Ludox te gebruiken om de monsters te zuiveren, bleek een wattenfilter beter te werken. Deze methode leverde een goed werkbaar hoeveelheid nematoden op. De uitvoering van de DNA-analyse middels een Q-PCR leverde geen problemen op. Deze methode bleek zeer betrouwbaar en bijkomend voordeel is dat er geen specialisten voor determinatie meer nodig zijn. Deze pilot heeft aangetoond dat het goed mogelijk is om middels DNA-barcoding te bepalen welke nematodenfamilies aanwezig zijn in de waterbodem en in welke aantallen ze voorkomen. Op de gekozen locaties zijn met name veranderingen in families gevonden die eutrofiëring indiceren. Door het beperkte aantal herhalingen was het

niet mogelijk om statistisch onderbouwde uitspraken te doen over de resultaten. Toch zijn de resultaten uit deze pilot veelbelovend, omdat voor iedere locatie duidelijke signalen gevonden zijn. Dit is voldoende reden om verder onderzoek te doen aan het gebruik van nematoden.

Wat kunnen we ermee en het vervolg

Deze pilot heeft de potentie van nematoden als indicator voor de waterkwaliteit aangetoond, maar er zijn nog veel vraagtekens en open einden. Zo kunnen de nematoden nu gedetermineerd worden tot op familieniveau. Een flinke stap kan gemaakt worden in ecologische beoordeling wanneer tot op geslachtsniveau wordt gedetermineerd. Er loopt inmiddels een subsidieaanvraag bij het Netherlands Genome Institute om dit te realiseren. In een vervolgonderzoek willen we tevens meer herhalingen meenemen en een groter aantal locaties bemonsteren. In het onderzoek richten we de aandacht op de relatie tussen de samenstelling van de nematodengemeenschap en traditioneel gemeten waterkwaliteitsparameters. Door aan te sluiten bij lopend waterkwaliteitsonderzoek, liefst waar zowel chemische als biologische analyses worden gedaan, kunnen we kosteneffectief de toepasbaarheid van nematoden verder onderzoeken.

LITERATUUR

- 1) Van Megen H., S. van den Elsen, M. Holterman, G. Karssen, P. Mooyman, T. Bongers, O. Holovachov, J. Bakker en J. Helder. (2009) A phylogenetic tree of nematodes based on about 1,200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 11, pag. 927-950.
- 2) Neilson R., S. Donn, B. Griffiths, T. Daniell, K. Rybarczyk, S. van den Elsen, P. Mooyman en J. Helder (2009). Molecular tools for analysing nematode assemblages. In: *Nematodes as environmental indicators*, van M. Wilson en T. Kakouli-Duarte.
- 3) Helder J., A. van Hooff en S. Sollie (2011). Nematoden als indicator voor water(bodem) kwaliteit. DNA barcodes voor de kwantitatieve karakterisering van nematodengemeenschappen in waterbodems. Tauw. Rapport R001-4791328AIH-hda-V01-NL.
- 4) Helder J., R. Landeweert en I. Dinkla (2012). DNA barcoding-gebaseerde monitoring van (veranderingen in) nematodengemeenschappen in zoetwaterhabitats. Ministerie van Verkeer en Waterstaat / Deltares.
- 5) Arthington A., G. Yeates en D. Conrick (1986). Nematodes, including a new record of *Tobrilus diversipapillatus* in Australia, as potential indicators of sewage effluent pollution. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 37, pag. 159-166.
- 6) Bazzanti M. (2000). Macrobenthic nematodes as biological indicators in a Mediterranean lowland river in Central Italy: A case study. *Archiv für Hydrobiologie* 1, pag. 59-70.

Monstername in de watergang bij Klijndijk in november 2011.

