

Eerste resultaten DNA-gebaseerde biomonitoring kiezelalgen

In 2010 begon het project Hydrochip met als doel een DNA-chip te ontwikkelen waarmee men de biodiversiteit van aquatische habitats snel en objectief kan analyseren. De chip wordt initieel ontwikkeld voor kiezelalgen. Van ongeveer 80 soorten kiezelalgen zijn unieke DNA-fragmenten verwerkt in een eerste prototype van de chip. De eerste resultaten uit de praktijk zijn beschikbaar en zien er veelbelovend uit.

De kwaliteit van Europese oppervlaktewateren staat behoorlijk onder druk door zowel chemische, fysische, als biologische stressfactoren. Een goede waterkwaliteit is echter van groot belang voor de kwaliteit van de ecosystemen. De politiek erkent dit belang, hetgeen onder meer leidde tot het opstellen van de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW). Als uitvloeisel hiervan zijn waterbeheerders vanaf 2000 verplicht regelmatig te rapporteren over de kwaliteit van de door hen beheerde oppervlaktewateren. Hiervoor moeten grote aantallen water- en substraatmonsters relatief snel en betrouwbaar onderzocht worden. De vier biologische kwaliteitselementen van de KRW zijn fytoplankton, macrofyten, macrofauna en vissen. Fytobenthos, specifiek de kiezelalgen, wordt momenteel alleen in beeld gebracht voor stromende wateren en ongebufferde plassen. Deze gegevens worden vervolgens vertaald naar een kwaliteitscijfer (de Ecologische KwaliteitsRatio of EKR) voor het onderzochte water.

Het monitoringssysteem voor fytoplankton en -benthos is in Nederland momenteel gebaseerd op microscopisch onderzoek van indicatororganismen, dat een aantal nadelen kent vergeleken met de in dit artikel beschreven DNA-chip (zie afbeelding 1). Daarom begon in 2010 een multidisciplinaire onderzoeksgroep met de ontwikkeling van de Hydrochip: een DNA-gebaseerde analyse van water- en substraatmonsters die waterschappen en waterbeheerders in staat moet stellen om in de toekomst snel en betrouwbaar de fytoplankton en fytobenthos biodiversiteit en kwaliteit van oppervlaktewateren in kaart te brengen.

DNA-barcodering en -chips

De indeling van planten en dieren in groepen is traditioneel gebaseerd op zichtbare verschillen in vorm, kleur, grootte en afmetingen, op basis waarvan men soorten van elkaar onderscheidt. De laatste jaren wordt hiervoor steeds meer gebruik gemaakt van verschillen in DNA-samenstelling, omdat dit in een aantal gevallen gevoeliger blijkt te zijn en zich beter leent voor grootschalige analyses. In plaats van elk monster afzonderlijk door een expert te laten determineren kunnen met DNA-gebaseerde analyses tientallen tot

Voordelen van op DNA gebaseerde biomonitoring	
	<ul style="list-style-type: none">- objectief want gestandaardiseerd en geautomatiseerd- analyse van groot aantal verschillende organismen mogelijk- relatief snelle methode, daarom op resultaten gebaseerde sturing mogelijk- verhoogde analyse intensiteit (bewerking van meer monsters in tijd en ruimte)- relatief goedkoop
Nadelen van op microscopie gebaseerde biomonitoring	
	<ul style="list-style-type: none">- subjectief want resultaten baseren op de ervaring van de analist- selectief want slechts een deel van het biologische spectrum kan onderzocht worden- relatief langzame methode- gelimiteerde laboratoriumcapaciteit- gelimiteerde representativiteit van tijd en ruimte- relatief kostbaar

Afb. 1: Voor- en nadelen van biomonitoring met behulp van een DNA-chip.

honderden monsters tegelijkertijd worden geanalyseerd. De resultaten van die analyses worden vergeleken met een databank met gegevens (de genetische codes) van alle bekende soorten. Deze aanpak wordt inmiddels steeds meer gebruikt voor kiezelalgen of diatomeeën^{1,2)} en vormt de basis voor de ontwikkeling van de Hydrochip. Hiertoe worden op een oppervlak van glas of kunststof kleine stukjes DNA, die specifiek zijn voor de te onderscheiden soorten algen, naast elkaar aangebracht. Dit is de zogeheten *microarray* of chip (zie afbeelding 2). Zo kan een patroon worden gevormd waar tientallen tot enkele honderden verschillende DNA-codes in zijn verwerkt.

Werkwijze

De analyse van de soortsaanpak van een monster met de Hydrochip is een relatief eenvoudige procedure. Monsters worden op dezelfde wijze verzameld zoals dat nu gebeurt en beschreven staat in het Handboek Hydrobiologie³⁾. In het laboratorium gaat de Hydrochip-methode afwijken van het huidige protocol. In plaats van het prepareren van monsters voor microscopische analyse, wordt DNA geïsoleerd uit de monsters (zie afbeelding 3). Dit kan per monster gebeuren maar ook met grotere aantallen tegelijkertijd (tot 96 of veelvoud hiervan) plaatsvinden door gebruik te maken van automatiseringssystemen. Uit het totale DNA wordt één specifiek stuk vermeerderd en gekleurd, waarna een incubatie op de Hydrochip plaatsvindt. Na het uitvoeren van

enkele wasstappen kan de Hydrochip worden afgelezen, waarbij een patroon ontstaat. Het verkregen patroon kan dan worden vertaald naar een soortenlijst.

Eerste praktijkresultaten

In een eerste serie tests zijn in totaal 108 monsters zowel met behulp van de klassieke microscopische methode als met de Hydrochip geanalyseerd. De gebruikte eerste versie kan 75 soorten kiezelalgen aantonen. Planktonische kiezelalgen werden in 45 watermonsters en vastzittende kiezelalgen in 63 monsters (rietstengels of andere waterplanten) bestudeerd. De monsters zijn afkomstig van 19 locaties die elf van de in Nederland aanwezige meer- en riviertypes representeren. De opgestelde soortenlijsten werden vervolgens gebruikt om de trofiegraad van het herkomstwater te berekenen. Voor deze habitattyping werden ecologische indicatiewaarden van kiezelalgensoorten toegepast⁴⁾, zoals beschreven in het Handboek Hydrobiologie. Voor het habitaatkenmerk trofiegraad geeft de indicatiewaarde tussen 1 en 7 het optimum van de desbetreffende kiezelalgensoort weer. In een volgende stap werd de indicatiewaarde van de aangetroffen kiezelalgen-gemeenschap voor elk monster volgens het Handboek Hydrobiologie berekend. Afbeelding 4 toont een vergelijking van de habitattyping, berekend op basis van kiezelalgen-gemeenschappen opgesteld door zowel microscopische als DNA-gebaseerde analyse. Er blijkt een duidelijke overeenkomstige trend in de resultaten van de methoden te zitten, met de grootste verschillen bij de

indicatiewaarden voor oligo-mesotrofe en mesotrofe wateren. De oorzaak hiervan is dat de DNA-sequenties van de meeste kiezelalgensoorten met een oligo-mesotrofe of mesotrofe indicatiewaarde voor trofiegraad op dit moment nog niet in kaart gebracht zijn. Voor eutrofe en hypertrofe wateren blijken de berekende trofieklassen van de twee methoden wel goed overeen te komen. Voor de soorten met een eutrofe indicatiewaarde zijn reeds meer DNA-sequenties beschikbaar, waardoor deze soorten ook beter vertegenwoordigd zijn op de eerste versie van de Hydrochip.

Vooruitblik

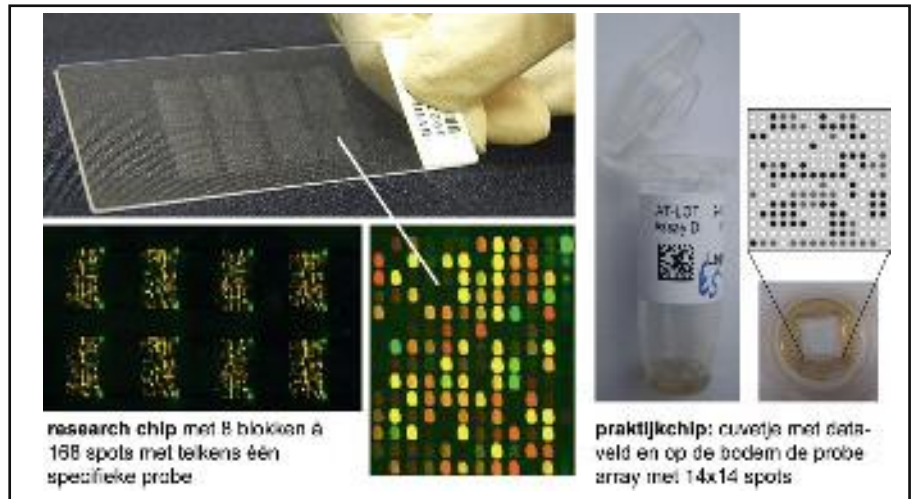
De resultaten verduidelijken de potentie die DNA-gebaseerde methoden in de reguliere biomonitoring kunnen hebben in de toekomst. Dit eerste onderzoek toont aan dat de Hydrochip een goede oplossing kan bieden voor het snel en objectief in kaart brengen van de soortensamenstelling van biologische monsters. Het is dan wel noodzakelijk dat de Hydrochip een betere dekking krijgt van de in Nederland aanwezige kiezelalgen. In totaal zijn voor Nederland 1.700 soorten beschreven en wordt de totale biodiversiteit op 2.500 soorten geschat³⁾. Bij de doorontwikkeling zal de nadruk liggen op die soorten die het meest voorkomen en die een belangrijke rol spelen als indicatororganismen. Op dit moment wordt hard gewerkt aan het verkrijgen van DNA-sequenties van diatomeeënsoorten waarvan deze informatie nog niet beschikbaar is. Deze informatie zal dan worden toegevoegd aan de huidige Hydrochip. Hierbij wordt ook veel aandacht besteed aan het zo goed mogelijk meenemen van de verschillende watertypen die in Nederland voorkomen. Het streven is om eind 2012 een versie van de Hydrochip te kunnen presenteren voor gebruik in routinematige monitoring en geschikt voor het bepalen van de KRW-klasse.

Op dit moment richt de Hydrochip zich alleen op kiezelalgen, maar op soortgelijke wijze kunnen vergelijkbare chips voor elke andere relevante groep van organismen worden ontwikkeld, waarbij blauwalgen nadrukkelijk in beeld zijn. Tevens bestaat de mogelijkheid om een chip te ontwikkelen waarmee meerdere verschillende groepen organismen, die nu voor biomonitoring worden gebruikt, in één procedure te analyseren zijn. De verwachting is dat DNA-gebaseerde analysemethoden de komende jaren een steeds grotere rol gaan spelen in de biomonitoring, zoals waterbeheerders die moeten gaan uitvoeren in het kader van de KRW.

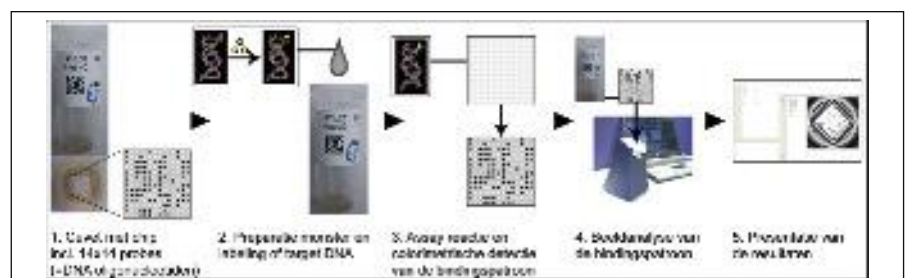
**Holger Cremer en Frank Schuren (TNO)
Bendert de Graaf (Vitens)
Bas van der Wal (STOWA)**

NOTEN

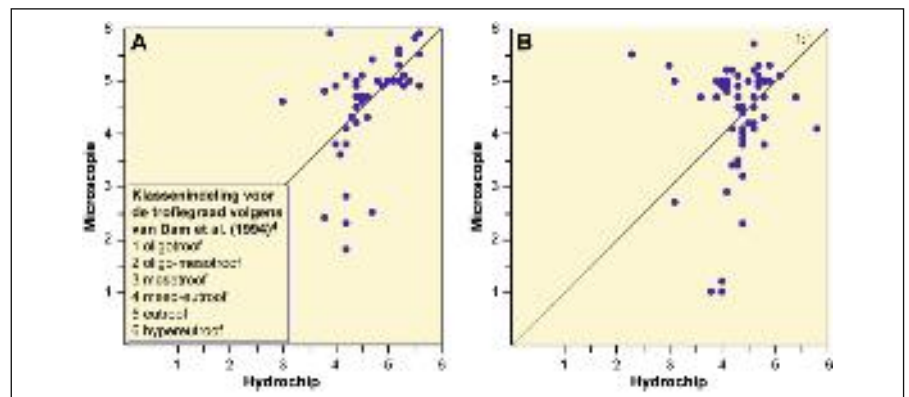
1) Mann D. en K. Evans (2007). Molecular genetics and the neglected art of diatomics. In: J. Brodie, J. Lewis (eds.) Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. Systematics Association Special jaargang 75. CRC Press, Boca Raton, pag. 231-265.



Afb. 2: Voorbeelden voor genetisch onderzoek en praktijkchips. De chips bevatten een grote hoeveelheid zogeheten spots met daarin vloeistoffen met DNA. Elk spot bevat één gen of sonde met een bekende sequentie die kernmerkend is voor één specifieke soort, bijvoorbeeld een diatomee.



Afb. 3: Schematische en vereenvoudigde weergave van de werkwijze van de Hydrochip-procedure. In een eerste stap wordt een chip gemaakt die specifieke sondes (= DNA-sequenties) van diatomeeënsoorten bevat (1). Vervolgens wordt DNA van diatomeeënsoorten uit het te toetsen water- of waterplantmonster geïsoleerd en gemarkeerd; hierna laten reageren van gemarkeerde DNA uit het monster met chip (2). Tijdens de reactie binden complementaire DNA-sequenties in het monster en de chip en resulteren in een bindingspatroon (3) die met speciale apparatuur middels transmissiedetectie uitgelezen (4) en met speciale computerprogramma's geanalyseerd (5) kan worden.



Afb. 4: Typering van het habitatkenmerk trofiegraad voor 45 fytoplankton (A) en 63 fyto benthos (B)-monsters. Alle monsters werden zowel met een DNA-chip (de Hydrochip) als ook microscopisch op diatomeeën getoetst. Vervolgens werd de trofiegraad getypeerd volgens de methode beschreven in het Handboek Hydrobiologie. Beide assen geven de klassenindeling weer voor de trofiegraad: op de x-as degene berekend op basis van soortidentificatie met de Hydrochip, en op de y-as degene die berekend werd op basis van microscopische soortidentificatie.

2) Evans K. en D. Mann (2009). A proposed protocol for nomenclaturally effective DNA barcoding of microalgae. Phycologia 48, pag. 70-74.
3) Bijkerk R. (2010). Handboek Hydrobiologie. Biologisch onderzoek voor de biologische beoordeling van Nederlandse zoete en brakke oppervlaktewateren. STOWA. Rapport 2010-28.
4) Van Dam H., A. Mertens en J. Sinkeldam (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands.

Netherlands Journal of Aquatic Ecology 28, pag. 117-131.
5) Van Dam H. (2010). Kiezelalgen. In: J. Noordijk, R. Kleukers, E. van Nieuwerkerken, A. van Loon (red.). De Nederlandse biodiversiteit. Nederlandse Fauna 10. Nederlands Centrum voor Biodiversiteit Naturalis & European Invertebrate Survey, pag. 131-133.