



Flowcytometer voor toetsing oppervlaktewater ten behoeve van actief biologisch beheer

MIGUEL DIONISIO PIRES, NIOO-KNAW CENTRUM VOOR LIMNOLOGIE

RICHARD JONKER, AQUASENSE

Eutrofiëring wordt tegenwoordig steeds meer bestreden door een combinatie van vermindering van de nutriëntenbelasting (bottom-up management) en actief biologisch beheer (top-down management). Bij actief biologisch beheer spelen vooral twee efficiënte grazers, de watervlo *Daphnia* en de driehoeksmossel *Dreissena* een potentieel belangrijke rol. Tot nu toe werd actief biologisch beheer in Nederland met wisselend succes uitgevoerd. Om de kans van slagen van deze beheersmaatregel te vergroten werden in een project, dat door de NWO-Technologiestichting STW gefinancierd werd, twee biotoetsen ontwikkeld waarmee van tevoren voor elk gewenst water type een goede inschatting gemaakt kan worden van de effectiviteit van deze twee grazers bij het verlagen van de concentraties aan zwevende deeltjes. Voor het meten van selectieve graas werd gebruik gemaakt van een speciaal voor fytoplankton ontwikkelde flowcytometer (de EurOPA) met een groot bereik aan te meten deeltjes (0.5–500 µm).

Het meeste oppervlaktewater in Nederland is ondanks alle fosfaatreducerende maatregelen nog steeds troebel door een hoge algenbiomassa, met name van cyanobacteriën. Vooral het overheersen van deze bacteriën is ongewenst, omdat hierdoor de functies van het water voor recreatie en visserij, maar zeker ook de drinkwatervoorziening worden bedreigd. Bij het terugdringen van de eutrofiëring zou gestreefd moeten worden naar een doorzicht in het zomerhalfjaar van 100–150 cm². Het lag voor de hand dat men de eutrofiëring in eerste instantie voornamelijk bestreed door de nutriëntenbelasting te verminderen. Vanaf de jaren zeventig echter werden pogingen ondernomen om dit 'bottom-up' management aan te vullen met actief biologisch beheer (top-down management)^{3,4}. Onderzoek toonde aan dat onder sommige omstandigheden *Daphnia*-soorten en/of de driehoeksmossel *Dreissena* de algenproductie effectief konden controleren, terwijl de nutriëntenbelasting gelijk bleef. Aanvullend actief biologisch beheer was echter lang niet altijd succesvol⁷. Om van tevoren een goede inschatting te kunnen maken of actief biologisch beheer een effectieve beheersmaatregel zou zijn, is een goed inzicht nodig in het selectieve graasgedrag van de meest efficiënte grazers in

de waterkolom (*Daphnia* en *Dreissena*) op het aanwezige fytoplankton.

Graasonderzoek werd tot op heden voornamelijk uitgevoerd door aan natuurlijk meerseton (algen, detritus, bacteriën) radioactief gelabelde algen toe te voegen. Door verschillende technische problemen die aan deze methode inherent zijn (sterke verschillen in de

mate van labelling van verschillende typen voedseldeeltjes) leverde dit type onderzoek weinig betrouwbare informatie op over het selectief eetgedrag van de grazers. In een door STW gefinancierd onderzoek is gebruik gemaakt van de EurOPA flowcytometer⁶. Het gebruik hiervan lost deze problemen op, omdat het met deze methode in principe mogelijk is alle sestondeeltjes één voor één te tellen en te categoriseren op grootte en aard. Hierbij wordt, in plaats van de opname van deeltjes door de grazers te meten zoals dit bij radioactieve labelling gebeurt, gekeken naar de snelheid van het verdwijnen van deeltjes uit het water.

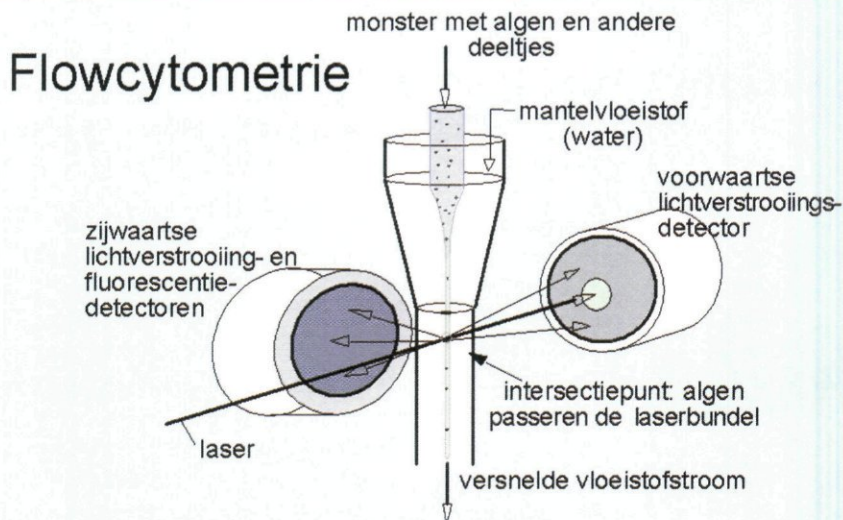
De grazers

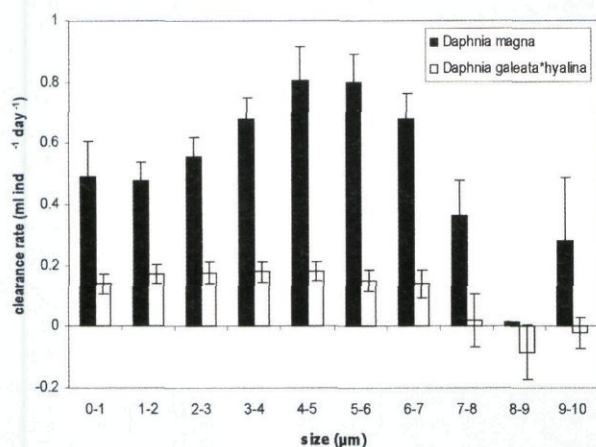
Bij het weer helder maken van troebel oppervlaktewater spelen zoals gezegd vooral de watervlo *Daphnia* en de driehoeksmossel *Dreissena polymorpha* een belangrijke rol. Grote en middelgrote *Daphnia*-soorten, zoals *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* en *Daphnia galeata*, zijn zeer efficiënte begrazers van het natuurlijke seston (algen, bacteriën, detritus). De meeste actief biologische beheersmaatregelen zijn gebaseerd op het verhogen van de populatiedichtheden van grote *Daphnia*'s en dus van de graasdruk³). In Nederland worden ook de driehoeksmosselen gezien als dieren die inzetbaar zijn als biomanipulatiemiddel in meren om de biomassa van algen te verminderen⁹. Dit heeft echter tot nu toe nog niet geleid tot een grootschalige toepassing, omdat nog onvoldoende kennis bestond over het foerageergedrag van deze mosselen.

De flowcytometer

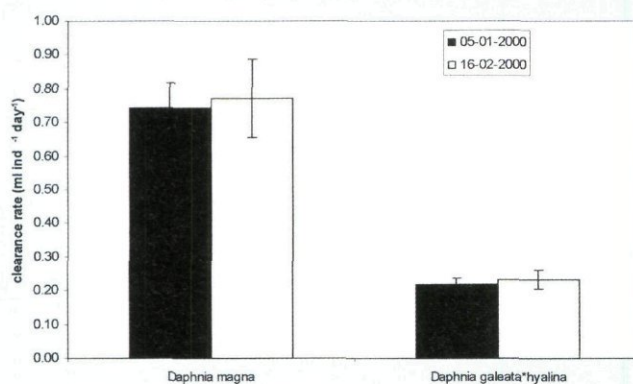
In een flowcytometer worden deeltjes individueel in een vloeistofstroom door één of meer laserbundels geleid. Op het moment van passage door een laserbundel verstrooien de

Afb. 1: Schema van de werking van de flowcytometer.





Afb. 2: De graassnelheid van *D. magna* en *D. galeata x hyalina* op diatomeeën en groenalgen als functie van de grootte van de algen.



Afb. 3: De graassnelheid van *D. magna* en *D. galeata x hyalina* op diatomeeën en groenalgen op twee meetdagen.

deeltjes het laserlicht en worden tevens eventueel aanwezige pigmenten geëxciteerd, waardoor fluorescentie wordt uitgezonden. Deze signalen (lichtverstrooiing en fluorescentie) worden gemeten met behulp van fotomultiplifiers. De signalen worden gekwantificeerd en op basis van deze signalen kunnen deeltjes optisch geklassificeerd worden. Dit proces is weergegeven in afbeelding 1. Het te analyseren monster wordt toegevoegd in het midden van een vloeistofstroom. Het monster wordt hierdoor hydrodynamisch gefocust, waarbij de vloeistofstroom met daarin de deeltjes bij passage door de laserbundel circa 30 μm in diameter is. Bij laserbundels met licht in het zichtbare gebied worden de pigmenten van fytoplankton geëxciteerd. Excitatie van chlorofyl-a leidt tot rode fluorescentie (> 650 nm). Excitatie van overige pigmenten leidt voor het grootste deel tot energieoverdracht naar chlorofyl, hetgeen ook tot rode fluorescentie leidt. Sommige pigmenten, waaronder fycocerythrine, geven voldoende fluorescentie (in dit geval oranje) om apart gemeten te worden. De hoeveelheid chlorofyl-a, overige pigmenten en de verhouding tussen chlorofyl-a en de overige pigmenten zijn de basis om groepen van fytoplankton te kunnen onderscheiden. Recentelijk wordt vooral in het mariene milieu de flowcytometrie steeds vaker toegepast voor aquatisch-ecologisch onderzoek en voor het klassificeren van algen of groepen van algen⁵.

Voor het onderzoek van STW is de EurOPA flowcytometer gebruikt⁵. Deze flowcytometer werd speciaal ontwikkeld voor de analyse van algen in oppervlaktewater. Hiervoor was een voorwaarde dat ook grote cellen en kolonies van cellen kwantitatief geanalyseerd zouden kunnen worden. Dit is bereikt door zowel een cuvet te gebruiken met een diameter van één millimeter als door de dataverwerking zodanig te ontwerpen dat zowel kleine (0.5 μm) als grote (tot circa 500 μm in diameter en enige milli-

meters lang) deeltjes verwerkt kunnen worden. Van de deeltjes wordt gemeten hoe lang ze zich in de laserbundel bevinden. Omdat de snelheid van de deeltjes constant is, kan hieruit hun lengte berekend worden.

Selectieve graas door *Daphnia*

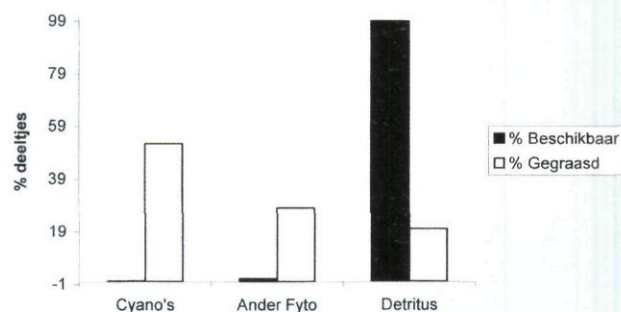
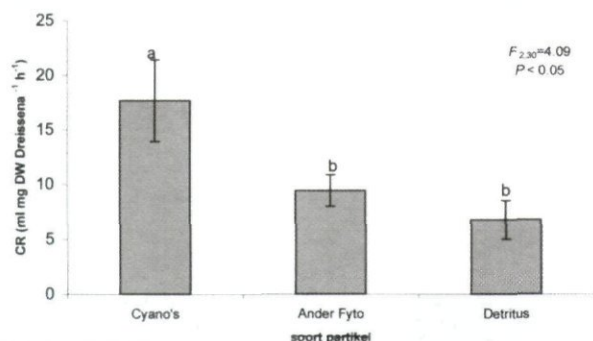
Gedurende de laatste jaren is vrij veel bekend geworden over het voedselgedrag van *Daphnia*-soorten. Op basis van experimenten en functioneel morfologisch onderzoek bestaat thans een vrij goed beeld over de kwalitatieve aspecten van de voedselselectie. Deze berust voornamelijk op de efficiëntie waarmee deeltjes van verschillende grootte en vorm op de zeefpoten in de carapaxruimte worden ingevangen en vastgehouden en op de efficiëntie waarmee ze vanaf deze zeven naar de mond worden getransporteerd. Selectie in engere zin vindt niet plaats en reuk, smaak of visuele selectie spelen dan ook geen rol. De selectie berust in de eerste plaats op de grootte en in de tweede plaats op de vorm van de deeltjes. De aard van de deeltjes (algen soort, bacteriën, detritus) speelt hierbij geen rol van betekenis. De ondergrens van de deeltjes die vastgehouden kunnen worden is niet helemaal duidelijk, maar ligt waarschijnlijk tussen de 0.3 en 1 μm en varieert met de soort en de grootte van de *Daphnia*'s. De maximale grootte van de deeltjes die opgenomen kunnen worden, hangt af van de ventrale carapax opening en is dus afhankelijk van de grootte van de *Daphnia*.

Daar over de kwalitatieve aspecten van voedselselectie al veel bekend was en selectie vooral aangrijpt op de grootte van de deeltjes, richtte het onderzoek zich vooral op de kwantitatieve aspecten van voedselopname door de watervlo: graassnelheden op deeltjes van verschillende grootteklassen en verschillende aard in relatie tot hun beschikbaarheid in het milieu. Op basis hiervan is een protocol voor een graastoets ontwikkeld.

Biotoets met *Daphnia*

De ontwikkelde biotoets behelst een eenvoudig opgezette graas-analyse die in het laboratorium wordt uitgevoerd. De toets meet de potentiële graas, dat wil zeggen het deel van het seston dat begraasd kan worden wanneer het aantal grazers niet beperkend zou zijn. De resultaten geven dus een indicatie van wat zou gebeuren met de sestonconcentratie en met de grootteverdeling van het seston na bijvoorbeeld een biomanipulatie als het wegvangen van zoöplankton-etende vis (actief biologisch beheer). Door middel van flowcytometrische analyse van de monsters is het mogelijk om voor iedere fytoplanktongroep (cyanobacteriën, cryptofyten, groenalgen met diatomeeën, detritus) de graasdruk te bepalen. De biotoets zelf is eenvoudig van opzet en kan uitgevoerd worden door bijvoorbeeld waterbeheerders. De analyse van de monsters is echter wel afhankelijk van de beschikbaarheid van een flowcytometer van het type EurOPA^{5,6}.

De graasmetingen worden uitgevoerd met een bekend aantal *Daphnia*'s van een bepaalde grootte in een bekend volume. Resultaten worden uitgedrukt in ml/grasdruk per *Daphnia* per dag en kunnen daarom vertaald worden naar veldsituaties met een bekend aantal *Daphnia*'s. De biotoets wordt uitgevoerd in viervoud in een volume van 150 ml. Aan de controles worden geen grazers toegevoegd. Aan de overige erlenmeyers wordt een vast aantal grazers toegevoegd. Na 24 uur worden alle erlenmeyers bemonsterd en de monsters gefixeerd. Deze worden geanalyseerd op de genoemde flowcytometer. Per monster worden 20000 deeltjes geanalyseerd. De toets werd uitgevoerd met *Daphnia magna* en *Daphnia galeata x hyalina*. In afbeelding 2 is de graasdruk als functie van de grootte van de algen weergegeven. Op basis van de zogeheten time-of-flight meting van de EurOPA flowcytometer zijn de deeltjes ingedeeld in tien grootteklas-



Afb. 4: Gemiddelde graassnelheid (± SE), in ml/mg mossel drooggewicht per uur, van volwassen mosselen op cyanobacteriën, ander fytoplankton (Other Phyto) en detritus uit Zwemlust.

Afb. 5: Het percentage deeltjes van drie sestongroepen (cyanobacteriën, ander fytoplankton en detritus) dat beschikbaar is (aan het begin van de graasexperiment, zwarte balken) en het percentage deeltjes van die groepen dat uit het water verdwijnt (witte balken) tijdens een graasexperiment met volwassen mosselen op seston uit Zwemlust.

sen. Uit de afbeelding blijkt duidelijk dat graasdruk zowel afhankelijk is van de grootte van de watervlo als van de grootte van de te eten deeltjes. Daar in deze experimenten gebruik gemaakt wordt van even oude *D. magna* en *D. galeata x hyalina* (acht dagen), waren de gebruikte *D. magna* veel groter (2.0 à 2.5 mm) dan de *D. galeata x hyalina* (circa 1.2 mm). Daardoor was de graassnelheid van *D. magna* veel hoger dan die van *D. galeata x hyalina*. De relatieve graasdruk over de verschillende grootteklassen voedseldeeltjes vertoonde echter slechts kleine verschillen. De kleinere *D. galeata x hyalina* graast efficiënt op deeltjes in de grootterange van 0-1 tot 6-7 µm, terwijl de grotere *D. magna* op iets grotere deeltjes in de range van 0-1 tot 7-8 en 9-10 µm efficiënt fou- rageert. De hoogste graassnelheden werden gemeten voor deeltjes in de grootte range van 2-7 µm. De test is goed reproduceerbaar (afbeelding 3). Dit is van belang in verband met de vergelijkbaarheid van de resultaten tussen verschillende tijden en monsterlokatie- ties. Grote verschillen in het selectief graasge- drag van de twee soorten bestaan niet. Daar *Daphnia magna* algemeen verkrijgbaar is en makkelijk te kweken, verdient het de voorkeur de toets met *Daphnia magna* uit te voeren.

Selectieve graas door driehoeksmosselen

Selectie van sestondeeltjes bij mosselen vindt plaats op de kieuwen, waarbij niet eetba- re deeltjes door middel van pseudofaeces uit de mossel worden verwijderd. Eetbare deeltjes worden over de kieuwlamellen naar de mond, die zich achterin de mossel bevindt, getrans- porteerd.

Het graasexperiment werd uitgevoerd met natuurlijk seston uit Plasje Zwemlust (Provin- cie Utrecht, bij Nieuwersluis). Dit seston bestond naast detritus deeltjes vooral uit dia-

tomceën (> 15.000 cellen/ml, gedomineerd door *Asterionella* (> 9.000 cellen/ml). Zowel groenalgen (50% *Chlorococcales* en 50% *Chlamy- domonas*) als cyanobacteriën (80% *Pseudo-anaba- ena*, rest losse cellen van allerlei soorten) kwa- men ongeveer drie maal zo weinig voor. De gemiddelde graassnelheden tussen verschil- lende deeltjesgroepen uit Zwemlust waren sig- nificant verschillend (afbeelding 4). Mosselen vertoonden de hoogste graassnelheden op cyanobacteriën en de laagste graassnelheden op detritus (niet-fluorescerende deeltjes). Indien het percentage beschikbare deeltjes van iedere sestongroep geplaatst wordt naast het percentage begrazing op iedere sestongroep, dan is duidelijk te zien dat de mosselen een sterke voorkeur hebben voor cyanobacteriën en ander fytoplankton boven detritusdeeltjes (afbeelding 5). Cyanobacteriën worden zeer sterk positief geselecteerd, terwijl detritusdeel- tjes zeer sterk worden afgewezen. Op basis van deze resultaten werd een protocol voor een graastoets ontwikkeld.

Biotoets met driehoeksmosselen

Net zoals de biotoets met *Daphnia* is de biotoets met de driehoeksmossel *Dreissena* een graas-analyse die makkelijk in het laboratoriu- m kan worden uitgevoerd. De toets meet wat mosselen potentieel zouden kunnen wegvan- gen als ze bijvoorbeeld in het veld als biofilter gebruikt zouden kunnen worden. Hiermee kan natuurlijk seston van binnenwateren worden getest op de mogelijkheid het door- zicht door middel van actief biologisch beheer te vergroten. Analyse van de monsters is afhan- kelijk van de beschikbaarheid van een flowcy- tometer. Het principe is gebaseerd op metin- gen aan individuele mosselen. Omdat de resultaten worden uitgedrukt per gewichts- eenheid van de mossel, kunnen ze vervolgens vertaald worden naar de aanwezige biomassa van mosselen in het veld. ■

Voor meer informatie over het verrichten van biotoetsen kunt u contact opnemen met: Miguel Dionisio Pires van het NIOO: (0294) 23 94 09.

LITERATUUR

- 1) Benndorf J. (1988). Biomanipulation. *Limnologica* 19, pag. 1-110.
- 2) Hosper S. (1978). De ontwikkeling van richtlijnen voor fos- faatconcentratie en fosfaatbelasting voor Nederlandse wateren. *H₂O* pag. 329-334.
- 3) Hosper S., E. Jagtman en M-L. Meijer (1987). Actief biolo- gisch beheer, nieuwe mogelijkheden bij het herstel van meren en plassen. *H₂O* pag. 274-279.
- 4) Hosper S. en E. Jagtman (1990). Biomanipulation addi- tional to nutrient control for restoration of shallow lakes in The Netherlands. *Hydrobiologia* 200/201, pag. 523-534.
- 5) Jonker R., J. Meulemans, G. Dubelaar, M. Wilkins en J. Ringelberg (1995). Flow cytometry: a powerful tool in ana- lysis of biomass distributions in phytoplankton. *Water, Science and Technology* 32, pag. 177-182.
- 6) Laanbroek H., J. Vijverberg, E. van Hannen, M. Dionisio Pires en R. Jonkers (2002). Grazing analyse m.b.v. flowcy- tometrie. Eindrapport STW project BBL4145. NIOO- KNAW, Centrum voor Limnologie.
- 7) Meijer M-L. (2000). Biomanipulation in The Netherlands: fifteen years of experience. Proefschrift Wageningen Uni- versiteit.
- 8) Reckermann M. en F. Colijn (2000). Aquatic flow cytomet- ry: achievements and prospects. *Scientia Marina* 64-2.
- 9) Reeders H. en A. bij de Vaate (1990). Zebra mussels (*Dreis- sena polymorpha*): a new perspective for water quality management. *Hydrobiologia* 200/201, pag. 437-450.