

eDNA monitoring van tomaat en paprika in oppervlaktewater van het glastuinbouwgebied in Delfland.



## Colofon

Titel	eDNA monitoring van tomaat en paprika in oppervlaktewater van het glastuinbouwgebied in Delfland.
Tekst, foto's en samenstelling	K. van Bochove
In opdracht van	Hoogheemraadschap Delfland
Naam opdrachtgever	Robbert Ballings
Intern projectnummer opdrachtgever	
Rapportnummer	RA2019045
Datum oplevering rapport	23 maart 2021
Aantal pagina's	11
Wijze van citeren	van Bochove K, 2021. eDNA monitoring van tomaat en paprika in oppervlaktewater van het glastuinbouwgebied in Delfland. Rapport RA2019045, Datura, Wageningen.
Laboratorium analist	J. Rook
Collegiale toetsing	R. van Himbeek



### **Datura Molecular Solutions BV**

Agro Business Park 10  
6708 PW, Wageningen  
The Netherlands

[www.datura.nl](http://www.datura.nl)  
[info@datura.nl](mailto:info@datura.nl)

[kees.vanbochove@datura.nl](mailto:kees.vanbochove@datura.nl)  
0031(0)629455328

# Inhoudsopgave

1. Doelstelling.....	4
2. Methode .....	4
2.1 Meetproces.....	4
2.2 Veldbemonsteringen .....	4
2.3 DNA extractie.....	5
2.4 qPCR detectie .....	5
2.4.1 Werkingsprincipe.....	5
2.4.2 Ontwikkeling van qPCR techniek voor paprika en tomaat .....	6
2.5 Kwaliteitwaarborging bij eDNA onderzoek.....	6
2.5.1. Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden .....	7
2.5.2. Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden .....	7
3. Resultaten.....	8
3.1 Controle monsters .....	8
3.2 Metingen in drainwater van bedrijven .....	8
3.3 Metingen in oppervlaktewater .....	9
3.4 Relatie eDNA concentratie en afstand tot de bron .....	9
4. Discussie en conclusie .....	10
4.1 eDNA methode toepasbaar? .....	10
4.2 Keuze voor meettechniek .....	10
4.3 Conclusie.....	11

# 1. Doelstelling

De glastuinbouwsector heeft afspraken met de overheid gemaakt om emissies naar nul terug te brengen. Desondanks treedt er nauwelijks verbetering van de waterkwaliteit op. Bij het hoogheemraadschap van Delfland is daarom aandacht voor het opsporen van lozingen. De afdeling Toezicht & Handhaving voert daarom het project “Gebiedsgerichte Aanpak” uit. Met behulp van intensieve monitoring kunnen zodoende ongewenste emissiebronnen worden opgespoord.

Regelmatig worden verhoogde concentraties van nutriënten en gewasbeschermingsmiddelen gemeten in het oppervlaktewater. Echter is het vaak niet mogelijk om vast te stellen welk bedrijf verantwoordelijk is voor de betreffende emissies. Mogelijk kan eDNA van de geteelde gewassen dat gemeten wordt in het oppervlaktewater hierbij helpen. De hypothese is dat een emissie van nutriënten gepaard gaat met een emissie van DNA van de gewassen die geteeld worden. Zo kan de verhoging van de concentratie tomaten eDNA in het oppervlaktewater een aanwijzing zijn dat een emissie afkomstig is van een tomatenkweker.

Het doel van het huidige project was tweeledig:

1. Ontwikkeling van een methodiek waarmee de concentratie eDNA van tomaten en paprika's gedetecteerd kan worden in het oppervlaktewater.
2. Toetsen of een lozing inderdaad gepaard gaat met een verhoogde concentratie eDNA van tomaat of paprika.
3. Evalueren van de potentie van eDNA monitoring voor het opsporen van vervuilingbronnen in het glastuinbouwgebied van Delfland.

## 2. Methode

### 2.1 Meetproces

De veronderstelling is dat lozingen vanuit agrarische bedrijven gepaard gaan met het vrij komen van DNA van geteelde soorten. De ontwikkelde methode richt zich op het detecteren van dit zogenaamde eDNA (environmental DNA) in oppervlaktewater. In dit onderzoek is de focus gelegd op het detecteren van eDNA van tomaat en paprika doormiddel van een soort-specifieke qPCR detectie. Dergelijke analyse bestaat uit vier stappen (zie figuur 1). In de volgende paragrafen wordt de bemonstering en het laboratoriumproces in meer detail toegelicht.



Figuur 1. Schematische weergave van een concentratie bepaling van eDNA uit oppervlaktewater.

### 2.2 Veldbemonsteringen

De veldbemonsteringen zijn uitgevoerd door Roy Kalpoe, werkzaam bij Hoogheemraadschap van Delfland, volgens het bemonsteringsprotocol van Datura. Een medewerker van Datura is bij de eerste bemonstering aanwezig geweest om nadere aanwijzingen te geven voor de bemonstering.

Er zijn zeven monsters verzameld van drain- of leidingwater om de concentratie eDNA van tomaat en paprika hierin te bepalen. Verder zijn er acht monsters verzameld van het oppervlaktewater binnen het glastuinbouwgebied van Delfland waar verhoogde nitraatwaardes gemeten werden. Tenslotte zijn er zeven controlemonsters verzameld door medewerkers van Datura in het Delftse Hout. Vanwege de geïsoleerde ligging van deze plas was de verwachting dat de concentratie eDNA van tomaat en paprika op deze locatie zeer laag zouden zijn.

Om een goed beeld te krijgen van de eDNA concentratie op een locatie, zijn meerdere submonsters verzameld. Datura houdt een standaard aan van 28 submonsters. De 28 submonsters worden vermengd tot één monster. Het totale gefilterd volume per monster is één liter water. Het monster is in het veld gefiltreerd met behulp van een polyethersulfone filter met een porie grootte van 0,22 µm. Het eDNA van tomaat en paprika blijft achter op het filter. Het filter wordt geconserveerd in een CTAB buffer totdat het DNA geëxtraheerd wordt in het laboratorium van Datura. De monsters zijn per post verstuurd naar het laboratorium van Datura. Een uitgebreidere beschrijving van de bemonstering is beschikbaar in het bemonsteringsprotocol (opvraagbaar).

## 2.3 DNA extractie

De watermonsters zijn vervolgens in het laboratorium geanalyseerd op de aanwezigheid van het eDNA van tomaat en paprika. De eerste stap in het laboratoriumproces is het extraheren van het eDNA. Tijdens de extractie worden storende stoffen zo goed mogelijk verwijderd, en het resultaat is een buisje water met daarin zuiver opgelost DNA. In dit onderzoek is gebruik gemaakt van een phenol-chloroform extractie.

Vervolgens is een controle analyse uitgevoerd om te testen of DNA-detectie in een monster eventueel geïnhibeerd kan worden. Dit kan optreden doordat er te veel humuszuren of andere storende stoffen in het monster achterblijven. Dit is gedaan door een bekende hoeveelheid van een fragment artificieel DNA toe te voegen. Vervolgens wordt de concentratie gemeten van dit fragment artificieel DNA. Dit wordt zowel gedaan in een reactie waar een hoeveelheid monster aan toegevoegd wordt, als in een reactie waar geen monster aan toegevoegd wordt. Als DNA-detectie in een monster geïnhibeerd wordt, dan is de gemeten concentratie artificieel DNA in de reactie waar een monster toegevoegd wordt lager ten opzichte van de reactie waar geen monster aan toegevoegd is. Met name in zuur water, waarin veel organische deeltjes aanwezig zijn kan inhibitie optreden. In dit onderzoek bleek dat meerdere monsters geïnhibeerd werden. Om een betrouwbare kwantificatie te kunnen garanderen is daarom gekozen om de monsters standaard 10 maal te verdunnen.

## 2.4 qPCR detectie

### 2.4.1 Werkingsprincipe

De concentratie eDNA van gewassen in een geëxtraheerd eDNA monster kan bepaald worden met de qPCR methodiek. Een kwantificering van het eDNA met de qPCR techniek is zeer specifiek. Alleen het eDNA van een specifieke doelsoort kan worden gemeten. In dit project is de qPCR techniek ontwikkeld voor tomaat en paprika.

De afkorting 'PCR' staat voor Polymerase Chain Reaction. Dit betreft een enzymatische reactie waarbij DNA geamplificeerd (vermeerderd) wordt. Bij PCR wordt gebruik gemaakt van zo twee DNA primers. DNA primers zijn artificiële stukjes DNA, die zo ontworpen zijn dat ze uitsluitend aan het DNA van de doelsoort hechten. Tussen de beide primers bevindt zich een fragment DNA van ongeveer 100 nucleotiden (DNA bouwstenen). Dit stuk DNA wordt in de PCR geamplificeerd door een polymerase die het DNA-fragment tussen de twee primers gaat kopiëren. De PCR wordt in gang gezet door de temperatuur te beïnvloeden. Een PCR-cyclus bestaat uit volgende onderdelen:

- De primers hechten bij 50-60 °C aan het DNA;
- Het vermeerderen van het DNA door een polymerase vindt plaats bij 72 °C;
- De primers en het gekopieerde DNA laten los bij 95 °C;
- Vervolgens wordt de temperatuur teruggebracht tot 50-60 °C waardoor het proces opnieuw begint.

In elke PCR-cyclus wordt de hoeveelheid DNA verdubbeld. De hoeveelheid DNA neemt tijdens een PCR dus exponentieel toe. De hoeveelheid DNA die geamplificeerd is kan gemeten worden door een fluorescente probe toe te voegen. Zodra deze probe zich hecht aan het vermeerderde DNA van de doelsoort ontstaat er een fluorescent signaal. Dit signaal is gedetecteerd met behulp van een qPCR platform (CFX96 Touch™ van Bio-Rad). De 'q' hierin staat voor 'quantitative'. De hoeveelheid DNA kan namelijk gekwantificeerd worden. Hoe meer DNA er oorspronkelijk aanwezig was in een monster, hoe minder cycli er nodig zijn om de hoeveelheid DNA een bepaalde drempelwaarde (Ct-waarde) te laten passeren. Een laag aantal cycli (en dus een lage Ct-waarde) indiceert een hoge concentratie DNA. Een hoge Ct-waarde indiceert dus een lage concentratie DNA. Door naast de DNA-monsters met onbekende DNA-concentraties ook een DNA-monster mee te runnen waarvan de DNA-concentratie bekend is (de zogenaamde DNA standaard), kan berekend worden hoeveel DNA moleculen er aanwezig zijn in de DNA monsters.

### 2.4.2 Ontwikkeling van qPCR techniek voor paprika en tomaat

Om specifiek het eDNA van tomaat en paprika te kunnen detecteren is een soort-specifiek qPCR assay (=primers en probe) nodig. Het qPCR-assay voor tomaat is effectief voor alle tomatensoorten en rassen. Het qPCR-assay voor paprika detecteert naast alle paprikarassen ook eDNA van pepers en tabasco.

Om tot een betrouwbaar qPCR-assay voor paprika en tomaat te komen zijn de volgende ontwikkelings- en validatiestappen doorlopen:

#### Bio-informatica

1. Er is een referentiedatabase van chloroplast DNA-sequenties opgezet van de in Nederland voorkomende soorten uit de nachtschadefamilie (Solanaceae).
2. Op basis van deze referentiedatabase zijn soort-specifieke primers en probes (qPCR-assay) ontwikkeld. Zowel voor paprika als voor tomaat is een dergelijk qPCR-assay ontwikkeld.
3. Met behulp van bio-informatica software is getest of de ontworpen qPCR-assays vermoedelijk voldoende specifiek zijn voor tomaat en paprika. Een aantal qPCR-assays waarvan vermoed werd dat deze effectief zouden zijn, werd geselecteerd.

#### Validatie in het laboratorium

4. Vervolgens zijn de qPCR-assays in het laboratorium getest op DNA-monsters van tomaat en paprika. Op basis hiervan is het meest gevoelige qPCR-assay voor tomaat en voor paprika geselecteerd.
5. Met behulp van DNA-extracten van andere nachtschadesoorten is getoetst of inderdaad uitsluitend DNA van paprika/ tomaat gedetecteerd kan worden met de ontwikkelde qPCR-assays. Helaas bleek het eerste qPCR-assay dat ontwikkeld is voor tomaat niet effectief te zijn. Besloten is toen om de ontwikkeling van een qPCR-assay voor tomaat vanaf stap 2 opnieuw uit te voeren waarbij andere regio's van het chloroplast DNA gebruikt zijn voor de ontwikkeling van primers en probes. Het nieuw ontworpen qPCR voor tomaat bleek wel voldoende specifiek te zijn.

## 2.5 Kwaliteitwaarborging bij eDNA onderzoek

Om de kwaliteit van de analyses te kunnen waarborgen worden eDNA analyses uitgevoerd volgens strikte protocollen. Zodoende kan gegarandeerd worden dat het optreden van vals positief en vals negatieve waarnemingen tot het minimum beperkt worden.

### 2.5.1. Hoe vals positieve waarnemingen voorkomen worden

#### *Laboratoriumprocedures:*

1. Verschillende onderdelen van de analyse workflow worden uitgevoerd in fysiek gescheiden laboratorium ruimtes. Het samenstellen van de eDNA sample kits en het voorbereiden van de qPCR reagentia vindt plaats in een **DNA clean room**. Dit is een ruimte waarin geen DNA samples aanwezig zijn. Met deze aanpak kunnen we garanderen dat er geen DNA aanwezig is in de eDNA sample kits en de reagentia (zoals de primers en probes) die later gebruikt worden in de eDNA analyses. Het extraheren van de eDNA samples gebeurt in een **eDNA laboratorium**. Dit is een ruimte waarin uitsluitend lage concentraties DNA aanwezig zijn. Vervolgens worden hier de eDNA samples samen met de qPCR reagentia in een 96-well plaat gepipetteerd. Deze plaat wordt luchtdicht afgesloten. Tenslotte wordt de qPCR uitgevoerd in een **post-PCR laboratorium**. In dit laboratorium wordt het eDNA vermeerderd en hier zijn dus hoge concentraties DNA aanwezig.
2. Er wordt een **unidirectionele workflow** gehanteerd om contaminatie van de DNA clean room en het eDNA laboratorium te voorkomen. Dit houdt in dat materialen die eenmaal in het post-PCR laboratorium geweest zijn niet meer terug mogen naar de DNA clean room en het eDNA laboratorium. Ook mogen medewerkers van Datura niet dezelfde week van een post-PCR laboratorium terug naar de DNA clean room en het eDNA laboratorium.
3. In iedere analyse worden **controle analyses** uitgevoerd. Zo worden er samples geëxtraheerd waaraan geen slotwater wordt toegevoegd (zogenaamde extractie controles). In de qPCR worden naast de extractie controles ook negatieve PCR controles meegenomen. Zodoende kan heel nauwkeurig gemonitord worden of er inderdaad geen contaminatie optreedt.

#### *Contaminatie voorkomen in het veld:*

1. Het **sampling protocol** van Datura wordt gevolgd. Dit protocol schrijft een specifieke werkwijze voor. In de praktijk is gebleken dat er geen contaminatie plaats vindt als dit protocol gevolgd wordt;
2. Er dient rekening gehouden te worden met **waterverplaatsingen**. De sampling wordt daarom uitgevoerd op een moment dat er weinig stroming is. Zo worden eDNA samples niet verzameld direct na (hevige) regenval. Ook wordt er rekening gehouden met kunstmatig opgewekte stroming, bijvoorbeeld bij wisseling van zomer- naar winterpeil.

### 2.5.2. Hoe vals negatieve waarnemingen voorkomen worden

Naast vals positieve waarnemingen kunnen ook vals negatieve waarnemingen optreden. Daarnaast is uit diverse validatie studies gebleken dat het eDNA in sommige gevallen niet gedetecteerd wordt, ook al is de doelsoort wel aanwezig. Maatregelen die genomen worden om vals negatieve waarnemingen te voorkomen:

1. Per sample worden **28 subsamples** verzameld. Hiermee wordt de kans vergroot dat eDNA in het sample terecht komt.
2. Een zeer gevoelige **qPCR detectie** wordt uitgevoerd met behulp van **12 replica's**. Wanneer minder replica's uitgevoerd worden kan er minder gevoelig gedetecteerd worden. Meer dan 12 qPCR replica's leidt echter niet tot gevoeliger detectie;
3. Gebruik van een **zeer korte merker** van ongeveer 100 basepaar;
4. Van ieder sample wordt **vastgesteld of de qPCR detectie geïnhibeerd** wordt door storende stoffen. Als dit het geval is, wordt er een extra zuiveringstap uitgevoerd of wordt een monster verdund. Vervolgens wordt nogmaals getest of er inderdaad geen inhibitie meer optreedt (zie methode voor een uitgebreidere beschrijving);
5. Er wordt altijd een **positieve controle** reactie van doelsoort DNA meegenomen in de qPCR detectie. Deze controle reactie moet altijd resulteren in positieve detectie. Ook als alle samples negatief zijn, kan zodoende vastgesteld worden dat de detectie juist is uitgevoerd.

## 3. Resultaten

### 3.1 Controle monsters

In het oppervlaktewater in het glastuinbouwgebied werden op diverse locaties verhoogde concentraties eDNA van tomaat en paprika aangetroffen. Om de gemeten eDNA concentraties in perspectief te zetten zijn zeven monsters geanalyseerd die in 2017 en 2018 verzameld zijn in het Delftse Hout in de maanden mei, juni, juli en augustus. Alle zeven monsters zijn getest op tomaat en twee van deze monsters zijn getest op paprika. De verwachting was dat deze monsters geen eDNA van paprika en tomaat zouden bevatten omdat deze plas geïsoleerd ligt. In alle analyses van de monsters uit het Delftse Hout is geen eDNA van tomaat en/of paprika aangetoond. Dit geeft aan dat we ervan uit mogen gaan dat (als er gebruikt gemaakt wordt van de hier ontwikkelde eDNA techniek) er geen eDNA van tomaat en/of paprika in het oppervlaktewater gedetecteerd wordt tenzij eDNA van tomaat en/of paprika via een bron in het oppervlaktewater terecht komt.

### 3.2 Metingen in drainwater van bedrijven

In lijn met de verwachting werden er hoge concentraties eDNA aangetroffen in het drainwater, zowel bij de tomatenteler als bij de paprikateler (zie tabel 1). De concentraties eDNA zijn het hoogst in het drainwater op moment dat er geteeld wordt (bedrijf 2 en 3). Bij bedrijf 1 is gemonsterd op een moment dat er niet geteeld werd. Hier is drainwater bemonsterd voor en nadat er UV-ontsmetting uitgevoerd werd. Hieruit blijkt dat 50-90% van het eDNA afbreekt gedurende de UV-ontsmetting.

Bij de paprikateler werd in één van de vier monsters een zeer lage concentratie eDNA aangetroffen van tomaat. Dit kan twee oorzaken hebben:

- Of dit betreffen resten van een eerdere teelt;
- Of er is een lichte contaminatie opgetreden bij de bemonsteringsprocedure. Dat kan plaatsvinden via de lucht vanuit een nabijgelegen bedrijf of doordat de monsternemer tomaat gegeten heeft en via de adem een aantal moleculen in het monster geïntroduceerd zijn.

Om eventuele vervuilingen tijdens het laboratoriumproces te monitoren zijn er gedurende alle batches extracties en PCRs uitgevoerd waaraan geen monsternormmateriaal toegevoegd is. Deze analyses gaven allen negatief resultaat. Ook de controle monsters uit het Delftse Hout gaven allen negatief resultaat. Deze controles geven allen aan dat er geen contaminaties optreden tijdens de laboratoriumprocedure. De gemeten concentratie paprika is echter zeer laag (<300 moleculen per liter). Bij diverse eDNA toepassingen (bijv onderzoek naar vissen) kan op basis van dergelijke zeer lage concentraties eDNA wel degelijk vastgesteld worden of een soort op de locatie voorkomt. Specifiek in dit geval was er aan de overkant van de weg een kassencomplex aanwezig waar tomaten geteeld werden. Mogelijk dat zeer kleine fragmenten celmateriaal van tomaat via de lucht in het gefilterde watermonster zijn terecht gekomen. Op basis van de huidige pilot hebben we geen aanwijzingen dat dit kan leiden tot detectie van meer dan >300 moleculen per liter. Bij specifiek deze eDNA toepassing zou het mogelijk nodig kunnen zijn om een hogere grenswaarde voor een "positieve detectie" te hanteren omdat vervuilingen makkelijker kunnen optreden. Om foutieve interpretaties te voorkomen zou zekerheidshalve een concentratie <500 moleculen per liter als verwaarloosbaar geacht kunnen worden.

Tabel 1. Overzicht van de resultaten van de eDNA analyses op drainwater.

Locatie	Datum	Teelt	Tomaat (DNA mol/liter)	Paprika (DNA mol/liter)	Behandeld	Omschrijving
Bedrijf 1	12-2-2020	Paprika	264	11038	Nee	Drainwater voor UV ontsmetter
Bedrijf 1	12-2-2020	Paprika	0	4719	Nee	Drainwater voor UV ontsmetter
Bedrijf 1	12-2-2020	Paprika	0	1362	UV	Drainwater na UV ontsmetter
Bedrijf 1	12-2-2020	Paprika	0	1104	UV	Drainwater na UV ontsmetter
Bedrijf 2	10-6-2020	Tomaat	132178	0	Nee	Drainwater uit drainpunt
Bedrijf 2	10-6-2020	Tomaat	6312	0	Nee	Drainageput (onderbemaling)
Bedrijf 3	29-10-2020	Tomaat	43119	0	Nee	Leiding, 200 ppm nitraat



### 3.3 Metingen in oppervlaktewater

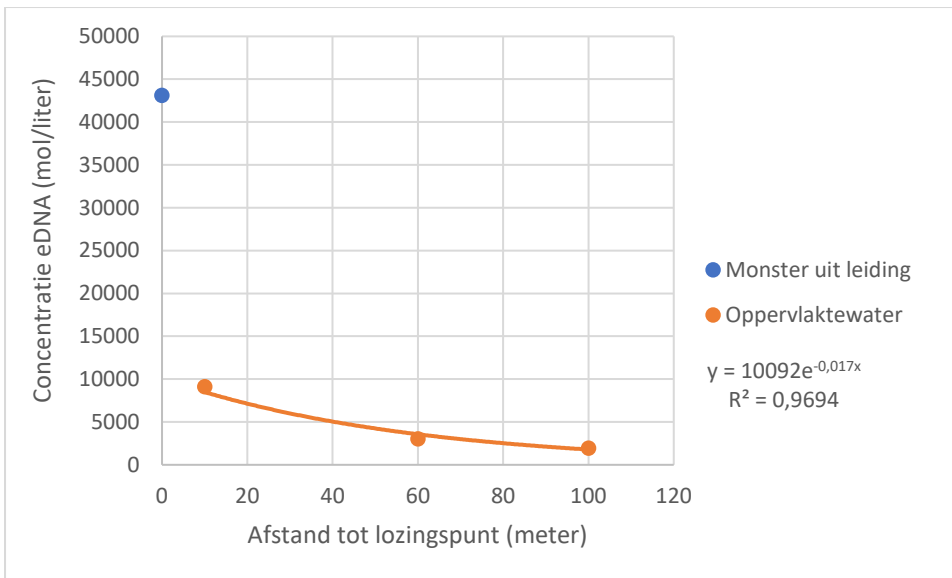
Uit de monsters blijkt een duidelijke relatie te zijn tussen aanwezigheid van tomaten- en paprikatelers en de gemeten concentraties eDNA van tomaat en paprika (zie tabel 2). Over het algemeen werden de hoogste concentraties eDNA gemeten van het gewas dat in de meest nabije kwekerij geteeld werd. Uitzondering hierop betreft een monster dat verzameld is op 12 februari 2020 in een sloot naast bedrijf 1. Daar werd weliswaar een hoge concentratie eDNA van paprika gedetecteerd, maar was de concentratie eDNA van tomaat ruim tweemaal zo hoog. Ongeveer 100 meter stroomopwaarts gelegen van het bemonsteringspunt is een tomatenteler gevestigd. Op de locatie van bemonstering was sprake van een verhoogde nitraatwaarde in het oppervlaktewater. Ondanks dat de tomatenteler op ongeveer 100 meter afstand gevestigd is werd er toch een behoorlijke concentratie eDNA van tomaat aangetroffen. Vermoedelijk werd de verhoogde nitraatwaarde niet veroorzaakt door lekkage bij de betreffende paprikateler, maar door de tomatenteler 100 meter stroomopwaarts.

Tabel 2. Overzicht van de eDNA metingen in oppervlaktewater.

Datum	Tomaat (DNA mol/liter)	Paprika (DNA mol/liter)	Dichtsbijzijnde teler	Afstand tot bekend lozingspunt
12-2-2020	14218	5931	Bedrijf 1, een paprikateler, tomatenteler op 100 meter	nvt
12-2-2020	130	0	Paprikateler	nvt
12-2-2020	881	181	Tomatenteler, en een paprikateler op 200 meter	nvt
12-2-2020	394	1095	Paprika, tomatenteler op 500 meter	nvt
10-6-2020	909	0	Bedrijf 2, tomatenteler	nvt
29-10-2020	9112	0	Bedrijf 3, tomatenteler	10 meter
29-10-2020	3040	90	Bedrijf 3, tomatenteler	60 meter
29-10-2020	1949	0	Bedrijf 3, tomatenteler	100 meter

### 3.4 Relatie eDNA concentratie en afstand tot de bron

Op 29 oktober werd bij een tomatenteler (bedrijf 3) een leiding bemonsterd die rechtstreeks loosde op het oppervlaktewater. In dit water werd een hoge concentratie nitraat gemeten (200 ppm). Een eDNA meting van tomaat resulteerde in een concentratie van 43.119 moleculen per liter, hetgeen ook een hoge concentratie is. Er werd geen eDNA van paprika gedetecteerd. Op verschillende afstanden stroomafwaarts van dit lozingspunt is vervolgens de concentratie eDNA bepaald in het oppervlaktewater (zie figuur 2). Hieruit bleek dat naarmate de afstand tot het lozingspunt groter was, de concentratie eDNA afnam. Dit verband was het sterkst als een exponentiële afname verondersteld werd ( $R^2=0,97$ ). Als een lineaire afname verondersteld wordt resulteert dit een correlatie met een  $R^2$  van 0,90. Echter zijn deze correlaties gebaseerd op slechts 3 meetpunten, dus enige terughoudendheid bij de interpretatie van het type verband is gewenst.



Figuur 2. Resultaten van een eDNA meting in geloosd leidingwater (blauw) en nabijgelegen oppervlaktewater (oranje). De concentratie eDNA nam af naarmate de afstand tot het lozingspunt groter werd.

## 4. Discussie en conclusie

### 4.1 eDNA methode toepasbaar?

Uit de resultaten blijkt dat er behoorlijke concentraties eDNA van gewassen aanwezig is in monsters die verzameld zijn in de drainage van bedrijven, met name als op dat moment geteeld wordt. Ook is aangetoond dat een lozing van dergelijk water leidt tot verhoogde concentraties eDNA in het oppervlaktewater én dat de eDNA concentratie afneemt met een grotere afstand tot het lozingspunt. Dit illustreert dat de qPCR-methode gebruikt kan worden bij het opsporen van bronnen van vervuiling.

Enige voorzichtigheid is geboden bij het interpreteren van metingen met concentratie <500 moleculen per liter. Aanwezigheid van dergelijke lage concentratie eDNA in een monster zou ook veroorzaakt kunnen worden door een contaminatie via de lucht.

De methode zou in de praktijk toegepast kunnen worden in situaties waarbij het onduidelijk is vanuit welke bedrijf geloosd/gelekt wordt. Dat kan zowel gedaan worden als reactie op een gemeten verhoogde nitraatwaarde, maar dit zou ook kunnen als onderdeel van een vast meetnet. In het onderliggende onderzoek is aangetoond dat een lozing in ieder geval tot 100 meter stroomafwaarts van het betreffende gewas gedetecteerd kan worden. Het is daarom aannemelijk dat met monitoring op een vast punt, waarbij periodiek bemonsterd wordt, verhoogde waarden van gewassen aangetoond zouden kunnen worden.

### 4.2 Keuze voor meettechniek

In het huidige project is gekozen voor het meten door middel van de qPCR-techniek. Voordeel van deze techniek is dat de resultaten (vanuit technisch oogpunt gezien) zeer snel uitgevoerd kunnen worden. Technisch gezien kan een monster binnen een dag geanalyseerd worden. In de praktijk moet de analyse ingepast worden in de laboratoriumplanning en zal het resultaat binnen enkele dagen geleverd kunnen worden. Eventueel kunnen de mogelijkheden verkend worden om de analyse in het veld uit te voeren door middel van een mobiel qPCR-systeem. Echter is het kosten efficiënter om de analyse in een laboratorium uit te voeren. In dit project is de qPCR-techniek ontwikkeld voor tomaat en paprika. In de toekomst kan de techniek uitgebreid worden naar

andere gewassen. Elke soort die toegevoegd wordt aan het analysepakket brengt echter wel meerkosten met zich mee. De qPCR-techniek heeft vooral meerwaarde als er ad hoc gereageerd moet worden op een vermeende lozing waarbij twijfel bestaat tussen enkele telers die een specifiek gewas telen.

Het alternatief is de toepassing van eDNA metabarcoding. Hiermee kan in één analyse de concentratie eDNA van alle gewassen bepaald worden. Niet alle gemeten DNA-sequenties kunnen tot op soort geïdentificeerd worden, maar de resolutie is hoog genoeg voor toepassing van de techniek. Metabarcoding wordt op dit moment verkend in een project dat uitgevoerd wordt als onderdeel van het project “DuurSaam Glashelder” (Vechtstromen, Waterschap Hunze en Aa’s en LTO Noord projecten). Nadeel is dat de doorlooptijd van dergelijke analyses vrij lang is (minimaal 1 tot maximaal 2 maanden), en de kosten relatief hoger zijn. De kosten voor een qPCR analyse op vijf soorten is vergelijkbaar met de kosten voor een metabarcoding analyse waarbij in één analyse de eDNA concentraties bepaald worden van alle gewassen. Een metabarcoding analyse heeft vooral meerwaarde als de resultaten niet noodzakelijk direct beschikbaar hoeven te zijn en de verhoogde nutriënten concentraties afkomstig kunnen zijn van tal van bedrijven. Een voor de hand liggende toepassing van de metabarcoding aanpak is de monitoring via een vast meetnet.

### 4.3 Conclusie

De ontwikkelde qPCR-methode kan in de praktijk ingezet worden om eDNA concentraties van tomaat en paprika te meten in het oppervlaktewater. Deze techniek kan bijdrage aan het opsporen van lozingen en lekkages bij tomaat- en paprikabedrijven en kan zowel ingezet worden om ad hoc opzoek te gaan naar een bron van vervuiling alsook voor monitoring via een vast meetnet. Bij een verdere uitrol naar nieuwe soorten dienen de voor- en nadelen van metabarcoding en qPCR techniek tegen elkaar afgewogen te worden.