

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU
BILTHOVEN

Rapport nr. 607601001

**Naar een indicator voor functionele diversiteit van
microbiële gemeenschappen**

voortgangsrapport

A.M. Breure, B.S. Wind, S.J.H. Crum¹, M. Rutgers

december 1997

¹ Staring Centrum DLO

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het Directoraat-Generaal Milieubeheer, Directie Stoffen Veiligheid en Straling in het kader van het project Functionele Biodiversiteit (projectnummer 607601).

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Postbus 1, 3720 BA Bilthoven,
telefoon: 030 - 274 91 11, fax: 030 - 274 29 71

VERZENDLIJST

1. Directeur van de directie Stoffen, Veiligheid en Straling, DGM-VROM,
Dr. C.M. Plug
2. plv. DG Milieubeheer, Dr.ir. B.C.J. Zoeteman
3. Drs. A.W.M. Eijs, DGM-SVS, Den Haag
4. Drs. C. Denneman, DGM-Bo, Den Haag
5. Mw. Drs. L. Oosterhuis, DGM-SVS, Den Haag

6. Dr. J. Bloem, AB-DLO Haren
7. Dr. W. de Boer, NIOO, Heteren
8. Dr. T. Brock, SC-DLO, Wageningen
9. Dr. J.W. Deneer, SC-DLO, Wageningen
10. Dr. P. Doelman, Iwaco, Rotterdam
11. Prof.Dr. P.C. de Rooter, AB-DLO Haren / RUU
12. Prof.Dr. N.M. van Straalen, VU, Amsterdam
13. Ing. H. Velvis, AB-DLO Haren
14. Ing. R.P.A. van Wijngaarden, SC-DLO, Wageningen
15. Depot Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie

16. Directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
17. Dr.ir. G. de Mik, RIVM-SB4
18. Dr. R. Alkemade, RIVM-LBG
19. Dr. P. van Beelen, RIVM-ECO
20. Drs. B. ten Brink, RIVM-LBG
21. Drs.ing. J.J. Bogte, RIVM-ECO
22. Prof.Dr. H. Eijsackers RIVM-ECO
23. Mw. M.L.P. van Esbroek, RIVM-LBG
24. Dr. O. Klepper, RIVM-ECO
25. Ir. W. Ligtvoet, ECO-LWD
26. Dr. J. Notenboom RIVM-ECO
27. Dr. L. Posthuma, RIVM-ECO
28. Drs. A.J. Schouten, RIVM-LBG
29. Dr. A. Sterkenburg, RIVM-ECO
30. Dr. J. Struijs, RIVM-ECO
31. Drs. T.P. Traas, RIVM-ECO
32. Drs. D. de Zwart, RIVM-ECO
- 33-36 auteurs
- 37 SBD/Voorlichting en Public Relations
- 38 Bureau Rapporten Registratie
- 39 Bibliotheek RIVM
- 40-60 t.b.v. Bureau Rapportenbeheer

ABSTRACT

This report describes the provisional results of the development of an indicator for the functional diversity of microbial populations by use of Biolog microtiterplates. Aquatic as well as terrestrial environmental samples were tested.

The report describes the experimental procedure and the manipulation of the measured data.

Two diversity indicators are distinguished, both calculated from the log logistic relation of the measured activity and the number of colony forming units (CFU). One indicator is the slope in the point of inflection and the other is the logarithm of the CFU necessary for 50 % of the maximal activity. The functionality of the proposed indicators is discussed.

INHOUDSOPGAVE

Samenvatting	5
1. Inleiding	6
2. Materialen en Methoden	8
2.1. Opzet van het veldexperiment met de proefsloten	8
2.2. Bepaling van de gevoeligheid van de microbiële populatie voor carbendazim	9
2.3. Bewerking van de grondmonsters	10
2.4. Bepaling van het aantal kolonievormende eenheden	10
2.4. Bepaling van de functionele diversiteit van microbiële populaties	10
2.5. Bewerking van de meetresultaten m.b.t. de functionele diversiteit	12
3. Resultaten en discussie	14
3.1. gevoeligheid van de microbiële populaties in de proefsloten voor carbendazim	14
3.2. Bepaling van de functionele diversiteit van de microbiële populaties in de proefsloten	15
3.3. Bepaling van de functionele diversiteit in de terrestrische grondmonsters	19
3.4. Vergelijking van aquatische en terrestrische populaties	19
4. Conclusie	21
5. Toekomstig onderzoek	22
6. Acknowledgements	23
Referenties	24

SAMENVATTING

In dit rapport zijn de voorlopige resultaten beschreven van de ontwikkeling van een indicator voor de functionele diversiteit van microbiële ecosystemen met behulp van microtiterplaten van Biolog. Voor dit doel werden twee soorten milieu monsters getoetst: watermonsters uit een project van SC-DLO, waarbij het effect van toediening van carbendazim op de samenstelling van het ecosysteem in proefsloten werd bestudeerd en terrestrische monsters afkomstig van de Wildekamp Hoeve in Bennekom.

Het rapport beschrijft de procedure en de uitwerking van de meetgegevens.

In het rapport worden twee biodiversiteitsindicatoren onderscheiden, die een maat geven van de verdeling van de geteste functies over de microbiële populatie. Zij worden berekend uit de log-logistische relatie tussen de gemeten activiteit en het aantal kolonie vormende eenheden (CFU). Eén indicator is de helling in het buigpunt, de andere indicator is de logaritme van de CFU die nodig is om 50% van de maximale activiteit te bereiken. De functionaliteit van de indicatoren wordt bediscussieerd. Beide indicatoren indiceren, dat de functionele diversiteit in de microbiële populaties van terrestrische oorsprong hoger is dan in die van aquatische oorsprong.

Daarnaast is met behulp van multivariate analyse nagegaan in hoeverre verschillende microbiële populaties van elkaar kunnen worden onderscheiden. De conclusie is dat de methode veelbelovend is en tot praktische resultaten leidt. Verschillende microbiële gemeenschappen in ecosystemen kunnen goed van elkaar worden onderscheiden, maar de statistische ontwikkeling van de methode behoeft verdere aandacht.

1. INLEIDING

In 1992 werd in Rio de Janeiro het verdrag gesloten waarin de landen die daaraan deelnamen toezegden een beleid te zullen voeren gericht op conservering van de biodiversiteit. In Nederland zijn twee ministeries betrokken bij dit beleid: Het Ministerie van LNV, dat een beleid heeft opgesteld voor de restauratie en conservering van natuurgebieden en het Ministerie van VROM, dat vanuit het milieubeleid biodiversiteitsdoelstellingen moet formuleren, die ook gelden buiten natuurgebieden. Het milieubeleid richt zich op het handhaven en veilig stellen van de life support functies, d.w.z. de biologische regulatie mechanismen en de nutriëntcycli. Deze functies worden voor een belangrijk deel uitgevoerd door cryptobiota, organismen met een verborgen levenswijze (bacteriën, schimmels, algen, wormen, springstaarten etc.). Om te komen tot biodiversiteitsdoelen, is het nodig om referentiegegevens te verzamelen voor relatief ongestoorde ecosystemen. Daarnaast moeten gegevens verzameld worden over ecosystemen waar een bekende milieudruk heerst. Een van de belangrijkste groepen cryptobiota wordt gevormd door bacteriën. In terrestrische systemen bestaat meer dan 50 % van de levende biomassa uit bacteriën. Ook in aquatische systemen wordt een zeer belangrijk deel van de omzettingen door bacteriën uitgevoerd. Referentiegegevens over de samenstelling van bacteriële ecosystemen zijn echter niet voorhanden. In dit rapport is de voortgang beschreven van een onderzoek naar de ontwikkeling van een karakteriseringsmethode voor microbiële populaties.

Het doel is, om een eenvoudige, automatiseerbare en goedkope methode te ontwikkelen, die kan worden toegepast binnen meetnetten. Een van de mogelijke toepassingen is in het kader van de bodembioologische indicator, zoals voorgesteld door Schouten *et al.* (1997).

In de recente literatuur wordt door verschillende auteurs gebruik gemaakt van standaard Biolog platen om microbiële populaties, of veranderingen daarin, te karakteriseren, b.v. Bossio en Scow (1995); Garland (1995); Knight *et al.* (1997); Lehman *et al.* (1997). Deze methode wordt zowel op monsters uit terrestrische als uit aquatische ecosystemen toegepast. Uit de resultaten van de verschillende onderzoekers blijkt een goed onderscheidend vermogen van de methode, doch er blijkt, behalve over het gebruik van de platen, geen overeenstemming te bestaan over de experimentele aanpak en over de verwerking van de data.

Gelijk met de vraag om methode ontwikkeling van een karakteriseringsmethode voor microbiële populaties startte een door SC-DLO opgezet experiment naar de effecten van toediening van het fungicide carbendazim op de samenstelling van ecosystemen in proefsloten. (SC-DLO, 1997). De specifieke vragen in het project waren: (1) welke effecten treden op bij een tijdelijke overschrijding van de normconcentratie van carbendazim; (2) in welke mate herstellen ecosystemen zich na een dosering; en (3) in welke mate treedt herstel op na herhaalde toediening van het fungicide.

De mogelijkheid om goed gecontroleerde monsters te nemen tijdens dit experiment is gebruikt voor de methode ontwikkeling.

Daarnaast zijn enkele grondmonsters onderzocht van de Wildekamp Hoeve in Bennekom, waar in een proefakker in 1978 een gecontroleerde koperverontreiniging is aangebracht . (Korthals *et al.* 1996).

Behalve voor methode ontwikkeling zijn de resultaten ook gebruikt om een uitspraak te kunnen doen over de veranderingen in de microbiële populaties in de proefsloten, die zich tijdens het experiment met carbendazim hebben voorgedaan.

2. MATERIALEN EN METHODEN

2.1. Opzet van het veldexperiment met de proefsloten

Het veldexperiment werd uitgevoerd in 12 proefsloten van de proefboerderij de Sinderhoeve in van SC-DLO te Renkum.

4 sloten werden niet behandeld en gebruikt als blanco, 4 sloten werden eenmaal besproeid met het fungicide carbendazim tot een concentratie van $330 \mu\text{g L}^{-1}$ en 4 sloten werden driemaal besproeid met het fungicide tot die concentratie. Een meer uitgebreide beschrijving van dit experiment is te vinden in de betreffende projectbeschrijving. (SC-DLO 1997).

Voor de duur van het experiment werd de bemonsteringsfrequentie toegepast zoals weergegeven in Tabel 1.

De monster bestonden uit 0,5 liter slootwater, verzameld uit het midden van de sloot in een steriele serumfles .

De monsters werden bewaard bij sloottemperatuur en op de dag van monsternamen naar Bilthoven gebracht en verwerkt.

Tabel 1

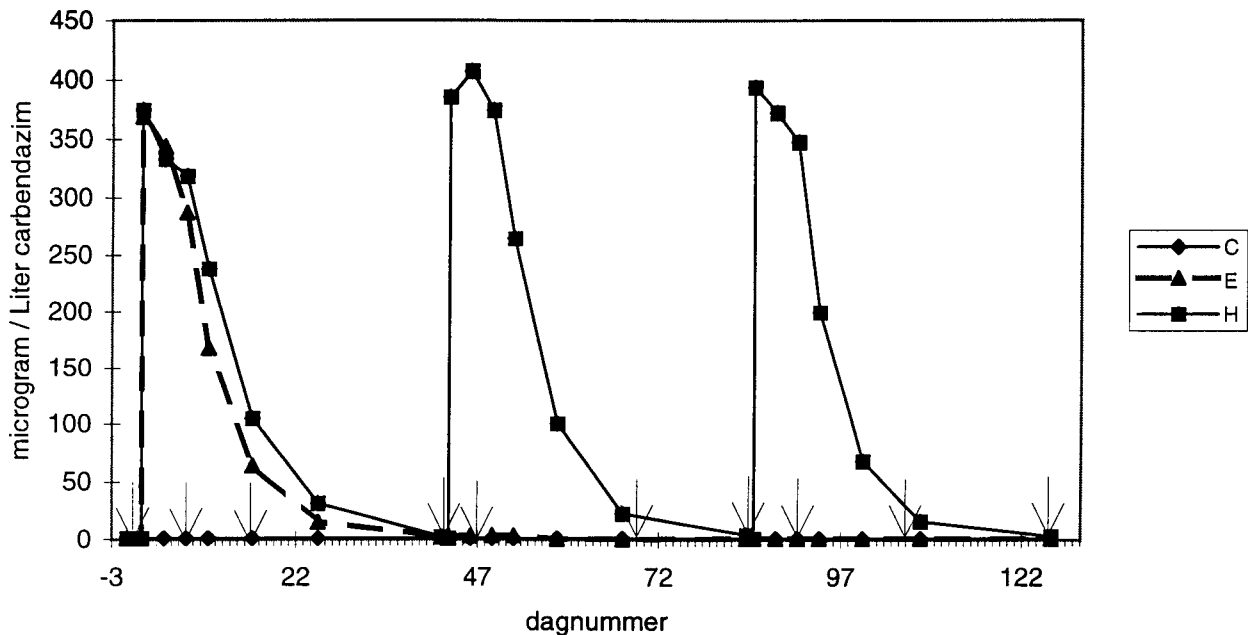
bemonsteringsschema van de proefsloten ten behoeve van de functionele diversiteitsbepaling

dg in cyclus		-1	6	15	42	6	27	42	6	21	42
slootnr	beh.	monsterdatum									
1	E	19/5/97	26/5/97		1/7/97			12/8/97			23/9/97
2	H	19/5/97	26/5/97	4/6/97	1/7/97		28/7/97	12/8/97	18/8/97	1/9/97	23/9/97
3	E			4/6/97		7/7/97			18/8/97		
4	C	19/5/97		4/6/97	1/7/97		28/7/97				23/9/97
5	E	19/5/97					28/7/97				23/9/97
6	C				1/7/97				18/8/97		
7	H	19/5/97	26/5/97		1/7/97	7/7/97		12/8/97		1/9/97	
8	H			4/6/97		7/7/97	28/7/97		18/8/97	1/9/97	
9	C		26/5/97					12/8/97			
10	H		26/5/97				28/7/97		18/8/97	1/9/97	23/9/97
11	E			4/6/97		7/7/97		12/8/97			
12	C					7/7/97				1/9/97	

C = controlesloot; E = éénmaal behandelde sloot, H = driemaal behandelde sloot. De sloten werden behandeld met carbendazim op dag 0 van de cyclus, die voor de tweede en derde cyclus overeen kwam met dag 42 van de voorgaande cyclus.

De carbendazim concentratie in de sloten werd gemeten m.b.v. een HPLC. Over 45 µm filters gefiltreerde watermonsters van 150 µl werden geïnjecteerd op een Novapak C18 (Waters) kolom (lengte 150 mm, diameter 4.6 mm, deeltjesgrootte 4 µm). Het eluens was een 60/40 mengsel van acetonitril en water, flowrate 0,7 ml.min⁻¹, temperatuur 40 °C. Detectie vond plaats met een Perkin Elmer LC-90 UV detector bij 285 nm. De gemiddelde concentraties over de 3 soorten sloten zijn weergegeven in Figuur 1.

De temperatuur werd continu in alle sloten gemeten en vastgelegd.



Figuur 1

Gemiddelde carbendazim concentratie in de drie typen sloten.

De bespuiting vond plaats op de dagen 0, 42 en 84, zie ook Tabel 1.

C = controlesloten; E = eenmaal gedoseerde sloten; H = driemaal gedoseerde sloten
de pijlen indiceren de bemonsteringsdata.

2.2. Bepaling van de gevoeligheid van de microbiële populatie voor carbendazim

Het supernatant van 5 min bij 500 g gecentrifugeerde watermonsters werden een factor 10⁻¹ verdund met een carbendazim oplossing in milli-Q water tot concentraties van 0, 44.1, 132.3, 441, 1323 en 4410 µg / L.

Deze suspensies werden vervolgens gepipetteerd in GN microtiterplaten van Biolog (150 µl / well).

Vervolgens werden de platen bij 25 °C geïncubeerd en de kleurontwikkeling in de tijd bepaald als eerder beschreven.

De gemiddelde gevoeligheid van de verschillende functies voor carbendazim werd bepaald op basis van de AWCD volgens de methode van Haanstra *et al.* (1985).

2.3. Bewerking van de grondmonsters

De grondmonsters werden genomen van de veldplots van de Wildekamp Hoeve (Korthals et al. 1996) met een ingestelde pH van 4.7 en een nominale koperconcentratie van 0 en 750 kg ha⁻¹.

De grondmonsters werden direct gezeefd op 2 mm en bewaard bij 4 °C.

Om de bacteriën uit de grond te extraheren werd 25 g grond gemengd met 250 ml 10 mM bis-tris buffer (pH 7) en bij kamertemperatuur 1 minuut geblenderd in een Moulinex type 719 blender met een volume van 1 liter. 10 ml van de suspensie werd vervolgens gecentrifugeerd bij 500 g en het supernatant werd gebruikt voor de beënting van de Biologplaten en de bepaling van het aantal kolonie vormende eenheden (CFU).

De koperconcentratie werd bepaald volgens SOP ECO/237/00 m.b.v. een atoom absorptie spectrometer van Perkin Elmer, type Aanalyst100.

De pH (KCl) van de grondmonsters is bepaald door 20 g grond in 50 ml 1 M KCl gedurende 2 uur te schudden bij 200 r.p.m. en vervolgens na 16 - 18 uur de pH te meten in het supernatant. (SOP ECO/009/03).

2.4. Bepaling van het aantal kolonievormende eenheden

Het aantal kolonievormende eenheden werd bepaald op 2 % (w/v) platen van Bacto agar (Difco) (φ 9 cm) met 0.1 % (w/v) trypton soya (Oxoid).

De platen werden geïncubeerd bij 25 °C en de kolonies werden geteld na 8 dagen.

2.4. Bepaling van de functionele diversiteit van microbiële populaties

De watermonsters werden steriel verwerkt op de volgende wijze: na centrifugering (5 minuten 500 g) werd van het supernatant een verdunningsreeks gemaakt van 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² en 10⁻³ in fysiologisch zout.

De verdunningsreeks werd gepipetteerd in Biolog GN 96 well microtiterplaten (150 µl / well). De wells van de platen bevatten 95 verschillende substraten (+ 1 blanco) en een tetrazoliumzout. Een overzicht van de substraten is gegeven in Tabel 2. Wanneer het substraat als gevolg van microbiële activiteit wordt omgezet, kleurt de indicator door reductie paars. De platen werden geïncubeerd bij 25 °C en de kleurverandering werd gedurende 8 dagen iedere 12 uur gemeten bij 590 nm in een SpectraMax 250 microtiterplatenlezer (Molecular Devices). De data werden verzameld m.b.v. het bijbehorende programma Softmax Pro.

Tabel 2
Substraten in een Biolog GN plaat

A1	water	A2	α -cyclodextrin	A3	dextrin	A4	glycogen	A5	tween 40	A6	tween 80	A7	N-acetyl-D-galactosamine	A8	N-acetyl-D-glucosamine	A9	adonitol	A10	L-arabinose	A11	D-arabitol	A12	cellobiose
B1	D-erythritol	B2	D-fructose	B3	L-fucose	B4	D-galactose	B5	gentiobiose	B6	α -D-glucose	B7	m-inositol	B8	α -D-lactose	B9	lactulose	B10	maltose	B11	D-mannitol	B12	D-mannose
C1	D-melibiose	C2	β -methyl D-glucoside	C3	D-psicose	C4	D-raffinose	C5	L-rhamnose	C6	D-sorbitol	C7	sucrose	C8	D-trehalose	C9	turanose	C10	xylitol	C11	methyl pyruvate	C12	mono-methyl succinate
D1	acetic acid	D2	cis-aconitic acid	D3	citric acid	D4	formic acid	D5	D-galactonic acid lactone	D6	D-galacturonic acid	D7	D-gluconic acid	D8	D-gluco-saminic acid	D9	D-gluconic acid	D10	α -hydroxybutyric acid	D11	β -hydroxybutyric acid	D12	γ -hydroxybutyric acid
E1	p-hydroxy phenylacetic acid	E2	itaconic acid	E3	α -keto butyric acid	E4	α -keto glutaric acid	E5	α -keto valeric acid	E6	D,L-lactic acid	E7	malonic acid	E8	propionic acid	E9	quinic acid	E10	D-saccharic acid	E11	sebacic acid	E12	succinic acid
F1	bromo succinic acid	F2	succinamic acid	F3	glucuronamide	F4	alaninamide	F5	D-alanine	F6	L-alanine	F7	L-alanyl-glycine	F8	L-asparagine	F9	L-aspartic acid	F10	L-glutamic acid	F11	glycyl-L-aspartic acid	F12	glycyl-L-glutamic acid
G1	L-histidine	G2	hydroxy L-proline	G3	L-leucine	G4	L-ornithine	G5	L-phenylalanine	G6	L-proline	G7	L-pyroglytamic acid	G8	D-serine	G9	L-serine	G10	L-threonine	G11	D,L-carnitine	G12	γ -amino butyric acid
H1	urocanic acid	H2	inosine	H3	uridine	H4	thymidine	H5	phenyl ethylamine	H6	putrescine	H7	2-amino ethanol	H8	2,3-butanediol	H9	glycerol	H10	D,L- α -glycerol phosphate	H11	glucose-1-phosphate	H12	glucose-6-phosphate

GN MicroPlate™

2.5. Bewerking van de meetresultaten m.b.t. de functionele diversiteit

De data verzameld via het programma Softmax Pro werden ingelezen in Excel 5.0

Op ieder meetmoment werd de gemiddelde kleurontwikkeling (average well color development (AWCD)) over de 95 wells bepaald volgens Bossio en Scow (1995)

De relatie tussen de AWCD na 8 dagen en de verdunning (aantal CFU / well) werd gefit met een log - logistische vergelijking van de vorm:

$$AWCD = b + \frac{t - b}{(1 + 10^{[\log CFU_{50,AWCD} - \log CFU] * h})} = b + \frac{t - b}{1 + \left[\frac{CFU_{50,AWCD}}{CFU}\right]^h}$$

Hierbij is t de maximale waarde van de AWCD en b de laagste. h is de helling in het buigpunt van de curve. Deze helling werd gebruikt als een maat voor de spreiding van de geteste functies over de populatie en daarmee voor de functionele diversiteit. De waarde werd bepaald m.b.v. het programma GraphPad Prism versie 2.0. Tijdens de fitprocedure werd de maximale AWCD genomen als 2.1. Een reïncultuur (lage diversiteit) levert de steilste helling en met een toenemende functionele diversiteit neemt de helling af. Een andere maat voor de biodiversiteit, die uit de vergelijking werd gehaald was de $\log CFU_{50,AWCD}$, die een uitdrukking geeft van de verspreiding van de gemeten functies over de microbiële populatie. Een lage $\log CFU_{50,AWCD}$ betekent een grote spreiding (veel functies met relatief lage activiteiten), een hoge $\log CFU_{50,AWCD}$ duidt op de aanwezigheid van dominante soorten (weinig functies met een hoge activiteit).

Om een multivariate analyse te kunnen uitvoeren van de data verkregen van verschillende microbiële populaties werden de data eerst genormaliseerd via de volgende procedures:

2.5.1. procedure 1

De relatieve activiteit van de populatie per geteste functie werd op de volgende wijze bepaald (zie ook Figuur 2A): Uit de gefitte curve van de AWCD en het aantal CFU / well werd de logaritme van het aantal CFU bepaald, waarbij de AWCD 50 % was van het maximum (de $\log CFU_{50,AWCD}$).

Daarnaast werd per well voor iedere verdunning de maximale kleurontwikkeling bepaald (WCD_{max}). vervolgens werd de WCD bepaald bij $\log CFU_{50,AWCD}$ ($WCD_{\log CFU_{50,awcd}}$). (Zie figuur 1a)

Vervolgens werd de relatieve bijdrage van een specifieke activiteit aan de totale activiteit berekend volgens de vergelijking:

$$\text{relatieve activiteit} = \frac{WCD_{\log CFU_{50,awcd}} - 0,5AWCD}{0,5AWCD} = \frac{WCD_{\log CFU_{50,awcd}}}{0,5AWCD} - 1$$

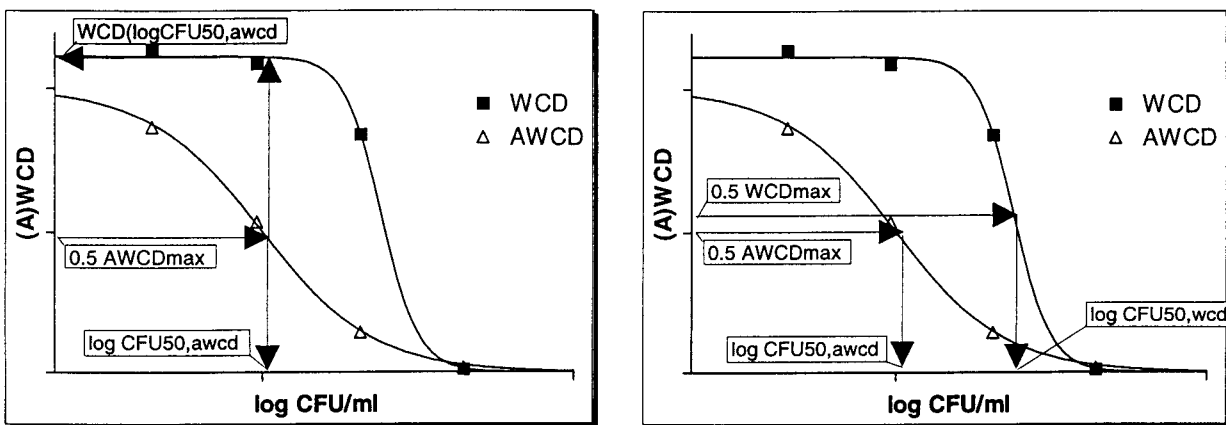
2.5.2. procedure 2

De relatieve verspreiding van de functies over de populatie werd op de volgende wijze bepaald (zie ook Figuur 2B):

Per well werd de log CFU bepaald bij 0.5 WCD_{max} (log CFU_{50,wcd}) (zie Figuur 1b) en vervolgens de relatieve bijdrage te bepalen volgens de vergelijking:

$$\text{relatieve verspreiding} = \log CFU_{50,AWCD} - \log CFU_{50,WCD}$$

De waarden die de beide verwerkingsmethoden opleverden konden dan worden geclusterd. De resultaten van de beide clusteringsmethoden kunnen grafisch worden weergegeven, en zijn daarna verder geanalyseerd via principale component analyse (PCA) m.b.v. het programma Matlab.



Procedure 1

Procedure 2.

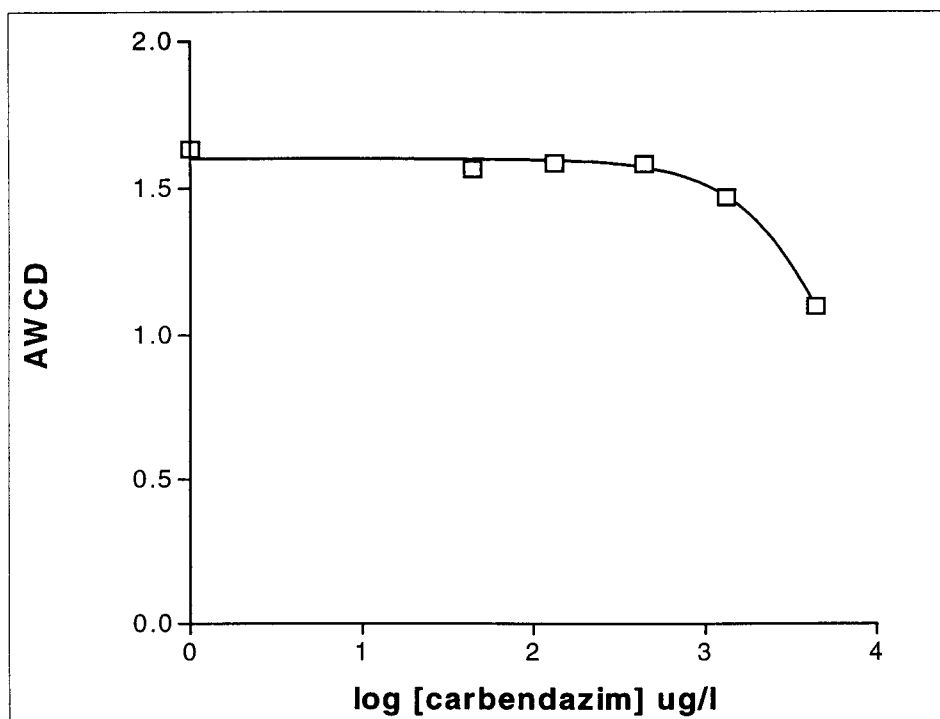
Figuur 2

Normalisering van de meetresultaten voor clustering. Voor toelichting zie tekst.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1. gevoeligheid van de microbiële populaties in de proefsloten voor carbendazim

De gevoeligheid van de microbiële populatie in de proefsloten werd bepaald door watermonsters uit niet met carbendazim behandelde sloten 10^{-1} te verdunnen in verschillende concentraties carbendazim. Een voorbeeld van een concentratie - effect relatie is weergegeven in Figuur 3. Uit de figuur is duidelijk te zien, dat de EC_{50} ligt bij $10^4 \mu\text{g L}^{-1}$. Bij $330 \mu\text{g L}^{-1}$ werd nog geen effect gemeten. De gemeten gevoeligheden zijn weergegeven in Tabel 3.



Figuur 3

concentratie - effect relatie van carbendazim

Bepaling van de gevoeligheid voor carbendazim na 3 doseringen van het fungicide leverde eveneens als resultaat dat de toegepaste concentratie carbendazim beneden de NOEC lag. Tijdens de metingen in september was ook door extrapolatie geen duidelijke EC_{50} te bepalen, daar de concentratie - effect curve nog geen afname te zien gaf bij de maximaal toegepaste concentratie carbendazim in het laboratorium. Dit zou er op kunnen wijzen, dat de populaties op latere tijdstippen minder gevoelig voor het fungicide zijn. Dit geldt dan voor zowel de blanco sloten als voor de driemaal met carbendazim behandelde sloten. (Tabel 3).

Tabel 3*gevoeligheid van de microbiële populaties voor carbendazim*

					330 µg/l
DATUM	SLOOTNR	BEHANDELING	LOG EC5	LOG EC50	LOG EC?
20/6/97	4	controle	3.0	3.9	0.013
18/8/97	2	3x carb	3.2	3.8	0.002
18/8/97	6	controle	2.6	4.6	0.055
1/9/97	2	3x carb	3.3	3.8	0.0001
1/9/97	10	3x carb	>4	N.D.	N.D.
1/9/97	12	controle	>4	N.D.	N.D.

N.D = niet meetbaar.

Uit Figuur 3 is duidelijk, dat de EC_{50} ligt ver voorbij de maximaal toegepaste carbendazim concentratie in de toxiciteitsbepaling. Een hogere concentratie kon niet worden getest omdat de maximale oplosbaarheid van carbendazim 4.9 mg L^{-1} bij $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ is. Op basis van de resultaten moet worden geconcludeerd dat in het veld een overschrijding van de EC_{50} van de bacteriën niet waarschijnlijk is.

Via de gebruikte methode kan niet worden uitgesloten, dat een of meer afzonderlijke functies een hogere gevoeligheid hebben dan het gemiddelde. Dit zal in de toekomst worden nagegaan.

De gekozen concentratie komt overeen met de EC_{50} van het meest gevoelige toetsorganisme (T. Brock, pers. mededeling). Carbendazim beïnvloedt de celdeling van schimmels (eukarioten). Het is dus niet onverklaarbaar, dat het weinig effect heeft op bacteriën.

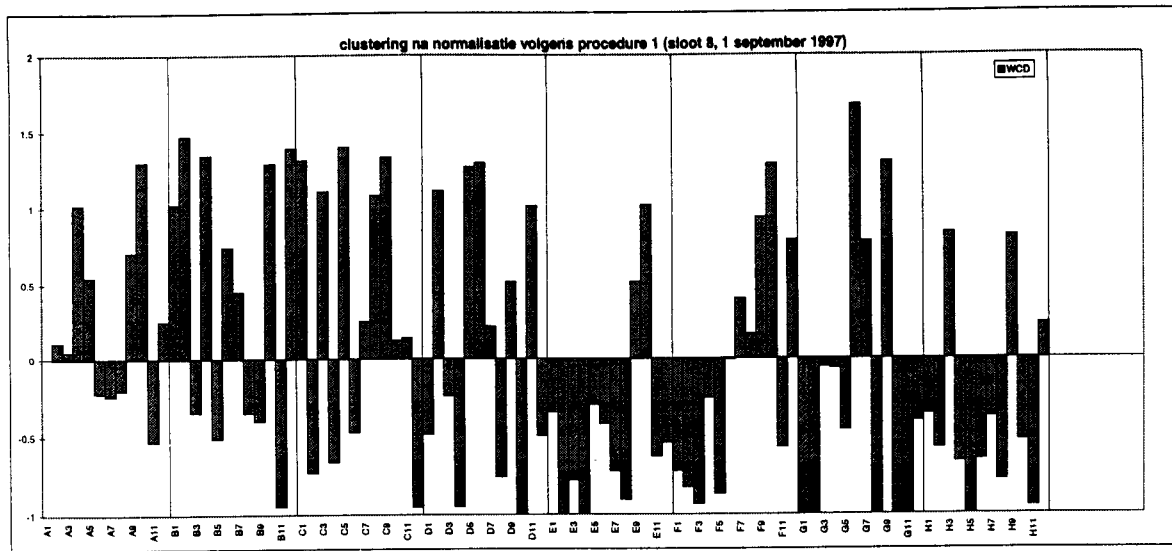
3.2. Bepaling van de functionele diversiteit van de microbiële populaties in de proefsloten

De biodiversiteitsindicatoren $\log CFU_{50,AWCD}$ en h van de monsters uit de proefsloten zijn weergegeven in Tabel 4.

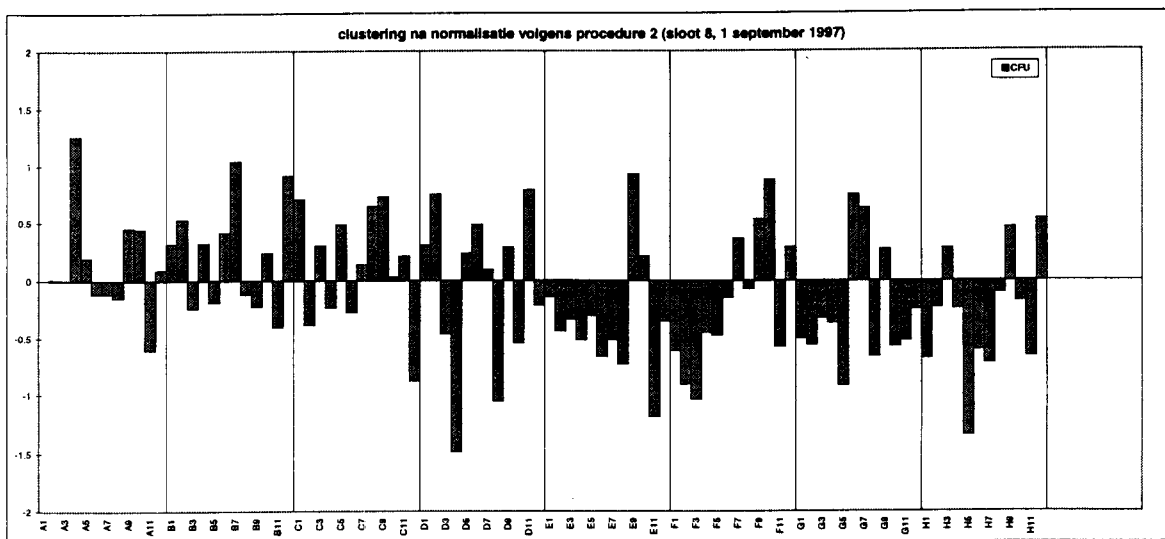
Zij liggen tussen 0.8 en 0.9 en indiceren daarmee een relatief lage biodiversiteit van de watermonster. De maximale waarde van deze indicator ligt bij 1.5 voor een reïncultuur (laagste diversiteit).

Er is geen verloop van de indicator te zien als functie van de tijd en de behandeling van de proefsloten. De bacteriedichtheid in de sloten was in alle gevallen 10^4 CFU.mL^{-1} . Ook de bacteriedichtheid is onafhankelijk van de tijd en de behandeling. De $\log CFU_{50,AWCD}$ is gemiddeld 3,1 en blijkt ook onafhankelijk van het monstertijdstip en de behandeling.

Een grafische weergave van de relatieve activiteitsberekeningen voor respectievelijk methode 1 en 2 zijn gegeven in de Figuren 4 en 5.



Figuur 4
relatieve activiteit van de verschillende functies, berekend volgens procedure 1.

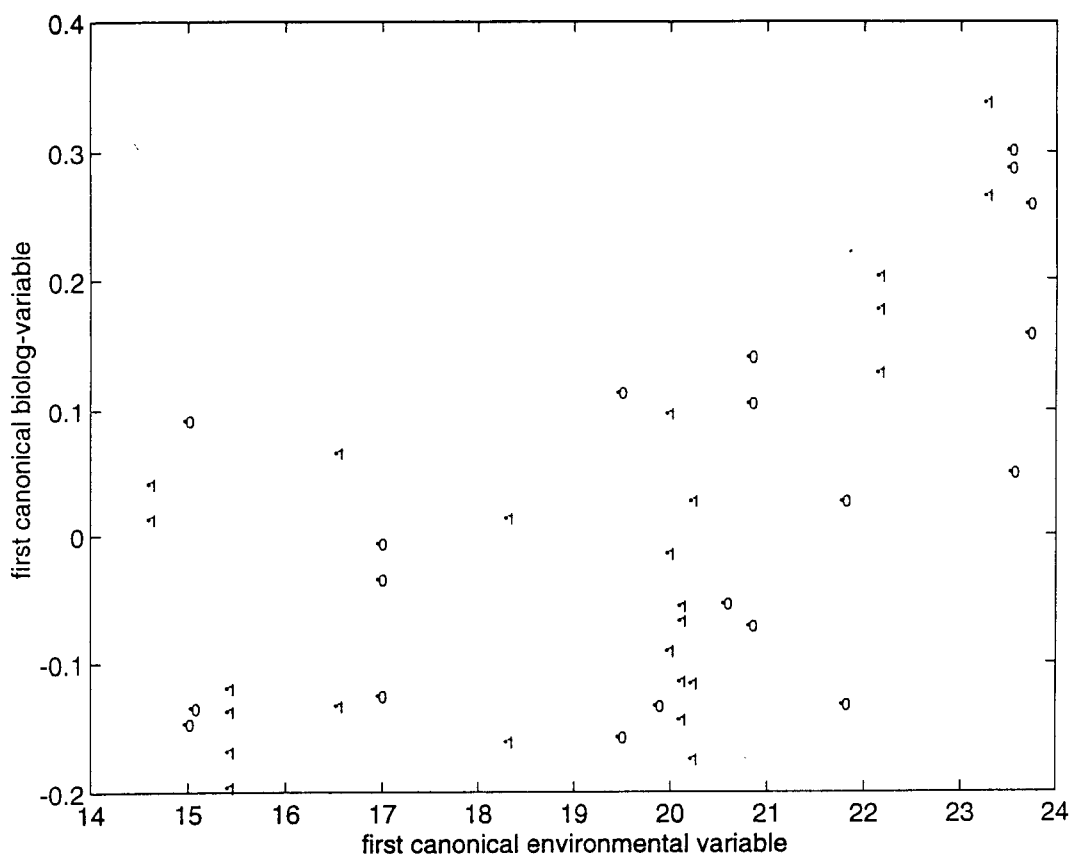


Figuur 5
de relatieve verspreiding van de verschillende functies, berekend volgens procedure 2

Tabel 4
Biodiversiteitsindicatoren per sloot

datum	19/5/97	26/5/97	4/6/97	17/97	7/7/97	28/7/97	12/8/97	18/8/97	1/9/97	23/9/97	gemiddeld	standaard dev.
beh. nr.	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50	log CFU50
	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
C 4	3.1	1.1	2.7	1.0	3.2	0.8	2.7	0.8	2.7	0.6	2.7	0.7
C 6												
C 9		3.3	0.8									
C 12									2.7	0.7		
E 1	3.2	0.7		2.7	0.9		3.2	1.1				
E 3												
E 5	3.8	N.D.	3.1	0.8	2.9	1.1	3.0	0.9		2.9	0.7	
E 11			3.3	1.0	2.6	0.6	3.4	0.6		3.1	1.0	0.3
H 2	3.7	1.1	3.4	0.8	3.2	0.9	3.5	1.0	3.1	1.3	3.0	0.8
H 7	N.D.	0.7	3.1	0.9	2.6	0.7	3.3	0.8	2.8	1.1		
H 8					3.0	0.9	3.0	0.8	2.4	0.9		
H 10			3.2	1.0	3.0	0.8	2.2	0.5	2.6	0.8	2.9	0.6
gemiddeld	3.5	0.9	3.1	0.9	2.9	0.8	3.3	0.9	2.7	1.0	3.1	0.9
standaard deviatie	0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.2

Bij het clusteren via PCA bleek er een zwak verband te bestaan met de monsterdatum. Dit kon voor een deel worden verklaard met een verschillende watertemperatuur ten tijde van de monsternamen (correlatie van 34%). (Figuur 6). Andere milieu-invloeden, zoals nutriëtsamenstelling, pH, lichtinstraling, etc., kunnen echter niet worden uitgesloten



Figuur 6

clustering van de resultaten van alle proefsloten via PCA.

Verder kon tot nu toe geen verband tussen de behandeling en de samenstelling van de populatie worden aangetoond. Op zich is dit niet verwonderlijk, omdat er ook geen blootstelling boven de NOEC heeft plaatsgevonden. Het feit dat er ook geen secundaire effecten werden waargenomen, ondanks hoge sterfte onder hogere organismen, kan mogelijk verklaard worden uit het feit dat onvoldoende monsters zijn geanalyseerd om een duidelijk verband aan te tonen.

Een andere reden kan zijn, dat bij de clustering is uitgegaan van de resultaten in alle wells. Mogelijk zal verdere analyse, waarbij niet-discriminerende wells (altijd positief of altijd negatief) van de clusteringsprocedure worden uitgesloten. Dit gaat verder worden uitgezocht.

3.3. Bepaling van de functionele diversiteit in de terrestrische grondmonsters

De pH (KCl) werd bepaald op 4.2 en 3.7 voor resp. de schone en vervuilde grond. De koperconcentraties werden bepaald op 67 en 161 mg.kg⁻¹ voor resp. de schone en vervuilde grond.

De biodiversiteitsindicatoren zijn weergegeven in Tabel 5. Omdat het hier gaat om slecht twee in duplo bepaalde monsters is geen statistische analyse gedaan. Opmerkelijk in dit geval is dat beide indicatoren wijzen op een hogere diversiteit in het koper-verontreinigde monster.

Tabel 5

De biodiversiteitsindicatoren per grondmonster

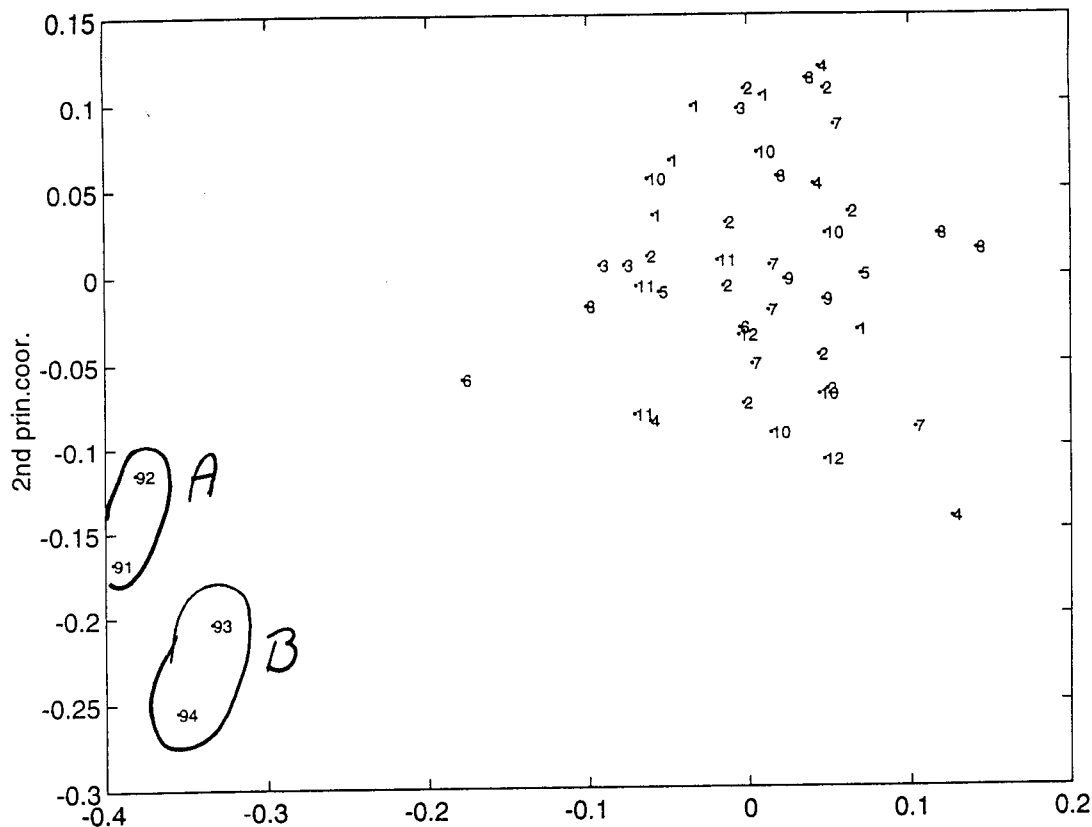
[Cu] kg/ha		log CFU _{50,AWCD}	h
0	A	1.9	0.6
	B	2.1	0.6
750	A	1.4	0.5
	B	1.4	0.4

3.4. Vergelijking van aquatische en terrestrische populaties

Vergelijking van de biodiversiteitsindicatoren in Tabel 4 voor de watermonsters en in Tabel 5 voor de terrestrische monsters maken duidelijk, dat de functionele diversiteit in de terrestrische monsters veel hoger is dan in de watermonsters. De log CFU_{50,AWCD} van de terrestrische monsters ligt ruim een eenheid lager (~2 v.s. ~3.1) en ook de h is veel lager (~0,6 v.s. ~0.9).

Om vast te stellen of er mogelijkheden bestaan om ecosystemen meer van elkaar te onderscheiden met behulp van multivariate analyse zijn de resultaten van de analyse van de terrestrische en de aquatische monsters in eenzelfde PCA meegenomen. Het resultaat van deze exercitie is gegeven in Figuur 7.

Uit dit plaatje is duidelijk, dat verschillende populaties kunnen worden onderscheiden en zelfs, dat een onderscheid kan worden gemaakt tussen de populatie verkregen uit de met koper verontreinigde lokatie en die van de schone lokatie. Dit is goed in overeenstemming met de resultaten van Smit *et al.* (1997), die in dezelfde lokaties de verschillen tussen de microbiële populaties hebben onderzocht op basis van het daar aanwezige bacterie-DNA.



Figuur 7

resultaten waarbij in een PCA zowel de waterige als de terrestrische monsters zijn vergeleken. Omcirceld punten zijn terrestrische monsters, schoon (A) en gecontamineerd met $750 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (B)

Het grootste verschil in aanpak van de methode in het onderhavige onderzoek met die van in de literatuur beschreven experimenten, is dat hier gewerkt wordt met een serie verdunningen van de bacterie-populaties. Over het algemeen wordt niet gecorrigeerd voor de dichtheid van bacteriën. Wij zijn van mening, dat onze aanpak een verbetering van de methode oplevert.

Multivariate analyse van de data lijkt een goede wijze van interpretatie van de resultaten. Het blijft echter de vraag, in hoeverre de toegepaste wijze van clustering de maximale informatie oplevert. De kinetiek van de kleurontwikkeling is niet in beschouwing genomen, hetgeen wel mogelijk is, gezien de resultaten beschreven door Lehman *et al.* (1997).

Ook de ontwikkeling van de indicator verdient nadere aandacht. Wij hebben voorlopig de helling (h) en de $\log \text{CFU}_{50, \text{AWCD}}$ van vergelijking 1 daarvoor gekozen. Een verdere analyse van deze keuze verdient aanbeveling.

4. CONCLUSIE

De toepassing van de Biologplaten bij de ontwikkeling van een indicator voor functionele diversiteit van microbiële populaties biedt goede mogelijkheden.

De methode bleek voldoende discriminerend om verschillende microbiële gemeenschappen te onderscheiden: als gevolg van de monsterdatum (temperatuur) in de monsters afkomstig uit de proefsloten, als gevolg van de koperverontreiniging in de terrestrische monsters en de aquatische en terrestrische monsters onderling.

De gekozen biodiversiteitsindicatoren wijzen er beiden op, dat de getoetste functies meer gelijkmatig verdeeld zijn in de terrestrische populaties dan in de aquatische populaties, d.w.z. de functionele diversiteit van de terrestrische populaties lijkt hoger dan die van de aquatische populaties.

Tijdens het onderzoek kon geen correlatie worden gelegd tussen de behandeling met carbendazim en de functionele diversiteit van de populaties. Redenen kunnen zijn een onvoldoende hoge blootstelling en een te gering aantal observaties.

5. TOEKOMSTIG ONDERZOEK

In het vervolg zal gezocht worden naar een optimalisatie van de clusteranalyse en zullen een groter aantal monsters worden geanalyseerd. Hieraan wordt momenteel gewerkt in het kader van het monitoren van ecosystemen i.h.k.v. het landelijk meetnet bodemkwaliteit.

De gegenereerde data zullen worden opgenomen in een bestand waaruit referentiewaarden voor functionele diversiteit in relatie tot abiotische omstandigheden en landgebruik zullen worden bepaald.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

Caroline van Rhenen (IBN-DLO) voerde de temperatuurmetingen uit, John Deneer (SC-DLO) deed de monsternamen, Rob Baerselman karakteriseerde de bodemonsters, Ilse van 't Verlaat deed een aantal biodiversiteitsbepalingen, Rens van Veen deed de koperbepalingen en Olivier Klepper deed de principle component analyse. Waarvoor dank.

REFERENTIES

- Bossio, D.A., Scow, K.M. (1995) Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 61:4043-4050
- Garland, J.L. (1995) Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 28:213-221
- Haanstra, L., Doelman, P., Oude Voshaar, J.H. (1985) The use of sigmoidal dose response curves in soil ecotoxicological research. *Plant and Soil* 84:293-297
- Knight, B.P., McGrath, S.P., Chaudri, A.M. (1997) Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper and Zinc. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 39-43
- Korthals, G.W., Alexiev, A.D., Lexmond, T.M., Kammenga, J.E., Bongers, T (1996) Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 979-985
- Lehman, R.L., Colwell, F.S., Garland, J.L. (1997) physiological profiling of indigenous aquatic microbial communities to determine toxic effects of metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:2232-2241.
- SC-DLO (1997) Onderzoek naar de lange termijn effecten van het fungicide carbendazim en de herstelbaarheid van populaties en ecosysteefuncties in proefsloten. 2e fase project 7470, DLO programmanummer 276
- Schouten, A.J., Brussaard, L., De Ruiter, P.C., Siepel, H., Van Straalen, N.M. (1997) Een indicatorsysteem voor life support functies van de bodem in relatie tot biodiversiteit. RIVM rapportnr. 712910005
- Smit E, Leeflang P, Wernars K (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 23:249-261