

Ontsmettingsmethodiek voor
zeegraszaden met het oog op een mogelijke
herintroductie van Groot zeegras (*Zostera
marina*) in het Grevelingenmeer

Lucien Hanssen
Marieke M. van Katwijk

November 2010

Ecoscience
Peter Scheersstraat 26
6525 DE Nijmegen

In opdracht van Rijkswaterstaat Zeeland

Samenvatting

Bij zeegrasherintroductie kunnen onbedoeld ziektes en niet-inheemse soorten worden meegeïntroduceerd. Om dit risico te minimaliseren, kunnen zaden in plaats van gehele planten worden gebruikt. Het gebruik van zaden biedt het voordeel dat grotere niet-inheemse organismen kunnen worden uitgewassen (en gemakkelijker kunnen worden waargenomen); ziektekiemen kunnen vervolgens worden bestreden met desinfectiemethoden.

Literatuurstudie wijst uit dat ontsmetting van zeegraszaden wereldwijd wordt gedaan, maar dat de effectiviteit en het effect op kiemkracht niet zijn onderzocht. Gangbare methoden zijn desinfectie met natriumhypochloriet en met ethanol.

We hebben deze desinfectiemethodes en hun combinatie getest op effectiviteit van ontsmetting en op kiemkracht van zaden van Groot zeegrass (*Zostera marina*) afkomstig van Saint Malo (Bretagne), Frankrijk. Zaden zijn op universele mariene kweekbodems geplaatst. Na 3 dagen bleken alle zaden in de controlebehandeling (=geen ontsmetting) te zijn besmet met bacteriën. Na zes weken was in de natriumhypochlorietbehandeling ongeveer de helft van de zaden besmet met bacteriën of schimmels. In de 70% ethanolbehandeling was slechts 15% van de zaden besmet met bacteriën of schimmels. In de gecombineerde behandeling was ook 15% van de zaden besmet, maar uitsluitend met schimmels. De kiemkracht werd niet beïnvloed door de behandelingen en was na 5 weken bij 15-20 PSU circa 35%.

Volgens de World Organisation for Animal Health zijn voor schelpdierkweek de volgende ziektekiemen en/of exoten van belang voor het Grevelingenmeer: *Bonamia ostreae*, *B. exitiosa*, *Mikrocytos mackini*, *Perkinsus marinus* en *Marteilia refringens*. Navraag bij het Centraal Veterinair Instituut wijst uit dat de eerste op dit moment al aanwezig is in Nederland, en de volgende drie komen niet in Bretagne voor. De grootste zorg gaat uit naar de protozo *Marteilia refringens*, welke via copepoden tussen de zaden zou kunnen worden geïntroduceerd.

Naast deze lijst is er het oesterherpesvirus. Hoewel de OsHV-1 μ var dit jaar (2010) in de Oosterschelde is aangetoond, zijn er nog geen aanwijzingen dat dit virus ook aanwezig is in het Grevelingenmeer. Wel is het virus in nagenoeg alle kweekgebieden van oesters in Frankrijk aanwezig. Met ethanol zou dit virus verwijderd kunnen worden, maar dit is niet in deze studie getest.

Vooralsnog is onduidelijk welke eisen de Natura 2000 wetgeving stelt aan een zeegrassaadproef.

Ontwikkeling van een ontsmettingsmethodiek voor zeegraszaden met het oog op een mogelijke herintroductie van Groot zeegras (*Zostera marina*) in het Grevelingenmeer

1. Herintroductie Groot zeegras

In de zeventiger en tachtiger jaren kwam meer dan 4000 ha Groot en Klein zeegras voor in het Grevelingenmeer en Oosterschelde, en een geringere hoeveelheid in het Veerse Meer. Nu is daar weinig meer van over. Een belangrijke oorzaak is het verdwijnen van de toevoer van zoetwater via het Hollands Diep en de Brabantse rivieren, met name in het Grevelingenmeer en de Oosterschelde. Het water is te zout geworden voor het zeegras, althans voor het type zeegras dat is aangepast aan zoetwaterinvloed zoals dat vanouds in het Grevelingen voorkwam (de Jong et al. 2004). Rijkswaterstaat laat een verkenning uitvoeren naar mogelijke oplossingen voor ecologisch herstel van het Grevelingenmeer, primair gericht op terugdringen van de zuurstofloosheid in grote delen van het meer. Uit de verkenning blijkt dat bij de Brouwersdam de doorstroming in het Grevelingenmeer kan worden hersteld door de doorlaatopening te vergroten. Met deze ingreep worden ook natuurwaarden versterkt, mede omdat zelfs in een kleine variant al grote arealen nieuw intergetijdengebied ontstaan.

Het terug dringen van de zuurstofloosheid biedt verbeterde kansen voor de herintroductie van Groot zeegras in het Grevelingenmeer. Het is echter weinig opportuun zaden voor herintroductie te verzamelen van de laatste populaties in Nederland. Velden van enige omvang (maar lage dichtheid) van Groot zeegras zijn alleen nog te vinden op de zandplaat Hond-Paap in de Eemsmonding en op een slik bij de Eemshaven. Het idee is om zaden uit het buitenland te halen. Bij voorkeur uit een gebied met hoge zoutgehalten. Onderzoekers van de Radboud Universiteit Nijmegen hebben deze zomer (2010) 1700 *Zostera marina* zaden voor experimentele doeleinden verzameld in de baai voor Saint Malo (Frankrijk, zoutgehalte doorgaans circa 34 PSU¹).

Het Grevelingenmeer is aangewezen als Natura 2000 gebied en valt onder het beheerplan Natura 2000 Deltawateren. Herintroductie van Groot zeegras is vergunningplichtig (provincies Zeeland / Zuid-Holland). Bovendien vereist het karakter van de herintroductie met het gebruik van buitenlandse zaden, dat er overleg wordt gevoerd met het Team Invasieve Exoten van het ministerie van LNV; thans Economische zaken, Innovatie & Landbouw (EL&I). Dit team adviseert over de potentiële schadelijkheid van invasieve exoten in Nederland en over de mogelijkheden om dat te voorkomen. Om de kans op import van exoten, maar ook van mogelijke ziektekiemen tot een minimum te beperken, is bewust gekozen om met zeegraszaden te werken in plaats van plantenstengels met bloeiwijzen.

Voordat buitenlandse zaden daadwerkelijk en grootschalig in een zeegrasrestauratieproject kunnen worden gebruikt, zal een effectieve methodiek ontwikkeld moeten worden om deze zaden vooraf afdoende te ontsmetten. De zaden die zijn verzameld in Saint Malo bieden de gelegenheid hiervoor een methodiek te ontwikkelen en te toetsen. Op basis van de bevindingen uit de restauratiepraktijk en de zeegrasliteratuur is een methode voor ontsmetting opgesteld die is afgestemd op het gebruik van zaden van *Zostera marina*. Tevens wordt er rekening gehouden met het feit dat bij een mogelijke herintroductie van Groot zeegras in het Grevelingenmeer een dergelijke methodiek ook op grotere schaal toepasbaar dient te zijn.

2. Bevindingen zeegrasnetwerk en literatuuronderzoek

Op basis van de contacten van de onderzoekers met internationale zeegraswetenschappers en met projectleiders van zeegrasrestauratieprojecten is een inventarisatie gemaakt van bestaande methodieken voor ontsmetting van zeegraszaden. Collega-onderzoekers is de vraag voorgelegd: *Do you have any experience with disinfecting seeds to avoid introduction of pathogenic and/or*

¹ PSU: Practical Salinity Units

exotic/invasive germs? De ontvangen reacties zijn weergegeven in bijlage 1, evenals de resultaten van een gerichte literatuur zoekopdracht op het *ISI Web of Knowledge*. Indien nodig is aanvullend literatuuronderzoek gedaan om de geïnventariseerde methodieken wetenschappelijk te onderbouwen.

In onderstaande tabel zijn de bevindingen weergegeven. Eerst zijn de resultaten voor *Zostera marina* zaden weergegeven, daarna voor zaden van twee andere zeegrassoorten *Posidonia* en *Thalassia* en voor een verwante plant *Ruppia*.

| Behandeling | hypo-chloriet | ethanol | fungicide | antibioticum | schoonspoelen | literatuur |
|---|---------------|---------|-----------|--------------|---------------|------------------------|
| R. Hughes Zaden <i>Zostera marina</i> | | | | | | Koch & Dawes 1991 |
| S. Wyllie-Echeverria Zaden <i>Zostera marina</i> | | | | | | Churchill 1992 |
| B. Orth Zaden <i>Zostera marina</i> | | | | | | Marion & Orth 2010 |
| A. Thorhaug Zaden <i>Zostera marina</i> | | | | | | personal communication |
| C. Tanner Zaden <i>Zostera marina</i> | | | | | | Tanner & Parham 2010 |
| D. Merrit Zaden <i>Posidonia</i> | | | | | | personal communication |
| E. Bunn Zaden <i>Posidonia</i> | | | | | | personal communication |
| E. Balestri Zaden <i>Posidonia oceanica</i> | | | | | | Balestri et al. 1998 |
| M. Durako Zaden <i>Thalassia testudinum</i> | | | | | | Moffler & Durako 1984 |
| M. Zarranz Zaden <i>Cymodocea nodosa</i> | | | | | | Zarranz et al. 2010 |
| E. Koch Rhizomen <i>Ruppia maritima</i> | | | | | | Koch & Durako 1991 |

3. Bewaren en voorbehandeling zaden

De verzamelde *Zostera marina* zaden zijn na het oogsten van de bloeiwijzen (9 augustus 2010, St Malo) bewaard in een plastic zak bij kamertemperatuur en op 12 augustus overgebracht in een waterbak met bruissteentjes in een ca 32 PSU zoutwateroplossing (Tropic Marin, Germany). Na het uitsorteren van de zaden en een handmatige schoonmaak (23 & 25 augustus 2010) zijn de zaden bewaard bij 6° Celsius in een 34 PSU zoutwateroplossing. Het kunstmatige zeewater is elke drie dagen verversed en de zaden zijn telkens geïnspecteerd. Slechte zaden zijn verwijderd. Voor het inzetten van de zaden in de betreffende ontsmettings- en groei-experimenten zijn de zaden opnieuw gekeurd. Zaden zijn als levensvatbaar beoordeeld als zij intacte zaadhuiden hadden, stevig aanvoelden bij het vastpakken met een pincet en snel zinken in zeewater. Slechte zaden voelen zacht, zijn beschadigd of zinken langzaam (Marion & Orth 2010, Tanner & Parham 2010). Van de 1700 zaden zijn er 50 als slecht beoordeeld en verwijderd (3 %).

4. Opstellen en testen ontsmettingsmethodiek

Desinfecteren of ontsmetten is het doden van eventueel aanwezige bacteriën, gisten, schimmels, protozoa, virussen en sporen met behulp van biocides. In deze ontsmettingsproef gebruiken we twee biocides op basis van de bevindingen uit de restauratiepraktijk en zeegrasliteratuur voor het desinfecteren van zeegraszaden: ethanol en natriumhypochloriet. Beide methodieken zijn afgestemd op het gebruik van zaden van *Zostera marina*. Tevens is er rekening gehouden met het

feit dat bij een mogelijke herintroductie van Groot zee gras in het Grevelingenmeer dergelijke methodieken op grote schaal en praktisch toepasbaar dienen te zijn.

Ook in de algemene ontsmettingsliteratuur en volgens de richtlijnen van de Werkgroep Infectie Preventie (WIP, een samenwerkingsverband van drie wetenschappelijke verenigingen op het gebied van infectiepreventie en ziekenhuishygiëne) zijn alcoholen en chloorverbindingen wijd gebruikte desinfecteermiddelen die tegen een breed scala aan micro-organismen inzetbaar zijn (WIP 2009). Een globaal overzicht is weergegeven in onderstaande tabel.

| Biocide | Alcoholen | Chloorverbindingen |
|---|----------------------|--|
| gebruiksconcentratie | Ethanol 70 % v/v | Nahypochloriet 0.5 % w/v |
| vegetatieve bacteriën | + | + |
| bacteriesporen | <i>niet werkzaam</i> | <i>traag werkzaam of incompleet spectrum</i> |
| mycobacteriën | + | + |
| lipofiele virussen (<i>herpes virus</i>) | + | + |
| hydrofiele virussen | + | + |
| schimmels | + | <i>traag werkzaam of incompleet spectrum</i> |
| gisten | + | + |

Een eerste methode betreft het wassen van de *Zostera marina* zaden gedurende 2 minuten in een oplossing van 70% v/v ethanol² en twee keer naspoelen van de zaden in steriel demiwater (demi water is gesteriliseerd met behulp van een autoclaaf: 20 minuten, 120° C, 15kP). Ethanol is het meest dodelijk in de samenstelling 70/30 (WIP 2009), doordat ethanol een vluchtig product is vindt de ethanolbehandeling plaats in een afgesloten potje.

Een tweede methode betreft het wassen van de *Zostera marina* zaden gedurende 5 minuten in een oplossing van 0,5 % w/v natriumhypochloriet³ en twee keer naspoelen van de zaden in steriel demiwater. Reinigen (schoonmaken & spoelen) van de zaden vooraf is noodzakelijk omdat resten organisch materiaal de werkzaamheid van het vrije chloor in de oplossing kunnen verminderen.

Een derde methode betreft een combinatiemethode: na een ethanolbehandeling wordt deze gevold door de spoelprocedure en een natriumhypochlorietbehandeling met spoelprocedure.

Als controle worden de *Zostera marina* zaden gedurende 5 minuten gewassen in steriel demiwater en twee keer nagespoeld eveneens in steriel demiwater.

Beide methodieken en de combinatiemethodiek zijn getest op een representatieve hoeveelheid zaden in een vijftal replica's om statistisch onderbouwde uitspraken te kunnen doen. Zie ook het schema van de proefopzet op pagina 6.

Na de behandelingen is er getest op achterblijvende bacteriën en schimmels door een deel van de behandelde zaden en de onbehandelde controlegroep op aparte petrischalen te brengen met een nutriëntenrijk agarmedium, gemaakt met zeezout om de mariene condities zo veel mogelijk na te bootsen (34 g zeezout, 5 g pepton, 1 g gistextract, 15 agarose, 1,6 mg ammoniumnitraat, 8 mg dinatriumhydrogeenfosfaat, aanvullen tot 1 liter met demiwater, pH stellen met 1M zwavelzuur tot 7,5 en autoklaveren; zie website www.dsmz.de).

² Procenteenheden volume / volume. Dat wil zeggen 70 ml ethanol en 30 ml water in totaal 100 ml oplossing.

³ Procenteenheden gewicht / volume. Dat wil zeggen 0,5 g natriumhypochloriet in 100 ml water oplossing.

Daarnaast is met een ander deel van de behandelde en de onbehandelde zeegraszaden een kiemingsexperiment ingezet. Hiervoor zijn de respectievelijke zaden groepen gebracht op een petrischaaltje met een 20 PSU zoutwateroplossing gemaakt met gedestilleerd water en Tropic Marin zeezout. Na twee weken is het kiemingspercentage vastgesteld en is de oplossing vervangen door 15 PSU zeewater om de kieming verder te bevorderen. Na vijf weken is opnieuw het kiemingspercentage vastgesteld.

De zeegraszaden die zijn behandeld met natriumhypochloriet in behandeling 3 en 4 (zie onderstaande tabel) zijn door de hypochlorietbehandeling een stuk lichter geworden ("gebleekt") en hebben in plaats van een donker grijs/bruine een licht grijs/bruine kleur gekregen.

Proefopzet

| Ontsmettingsmethodiek | | | | | | (21 september 2010) |
|-----------------------|---------------------|---------|---------------------|---------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Blanco | 5 x 30 zaden | spoelen | | | 5x 5 zaden inzet kweken | 5 x 25 zaden inzet kieming |
| 2. Ethanol | 5 x 30 zaden | spoelen | | | 5x 5 zaden inzet kweken | 5 x 25 zaden inzet kieming |
| 3. Ethanol+NaOCl | 5 x 30 zaden | spoelen | 5 x 30 zaden | spoelen | 5x 5 zaden inzet kweken | 5 x 25 zaden inzet kieming |
| 4. NaOCl | | | 5 x 30 zaden | spoelen | 5x 5 zaden inzet kweken | 5 x 25 zaden inzet kieming |

Materiaal

- 600 *Zostera marina* zaden
- 20 zaad bewaarpotjes
- Zaad selectiebak
- Gedestilleerd water (autoclaaf)
- Natriumhypochloriet oplossing 0,5 % W/V
- Ethanol 70% V/V
- Handschoenen (rubber)
- Pincet (steriel)
- 20 Spoelflesjes
- 20 Petrischaaltjes met medium (zeezout)
- 20 Petrischaaltjes
- 20 Filtreerpapierjes rond
- Kunstmatig zeewater 20 PSU
- Binoculair

Statistiek

Kiemingsresultaten zijn getest met t-toetsen (eenzijdig, gelijke varianties) met behulp van MS Excel 2003.

Kieming van de zaden in de voorraadpotjes

De kieming in de voorraadpotjes (34 PSU, 5-10 °C) is vrijwel nihil.

Foto 1. Overzicht agarplaten voor kweektesten zaadontsmettingsmethodieken

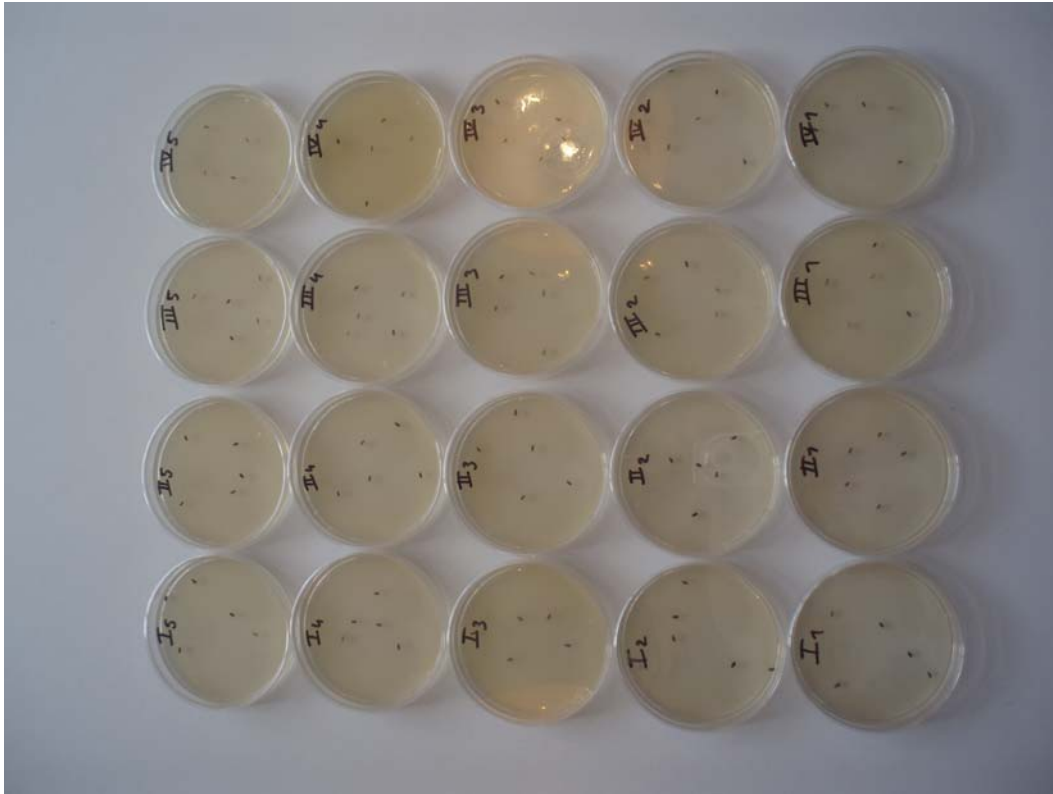


Foto 2. Overzicht petrischalen voor testen kiemingspercentages

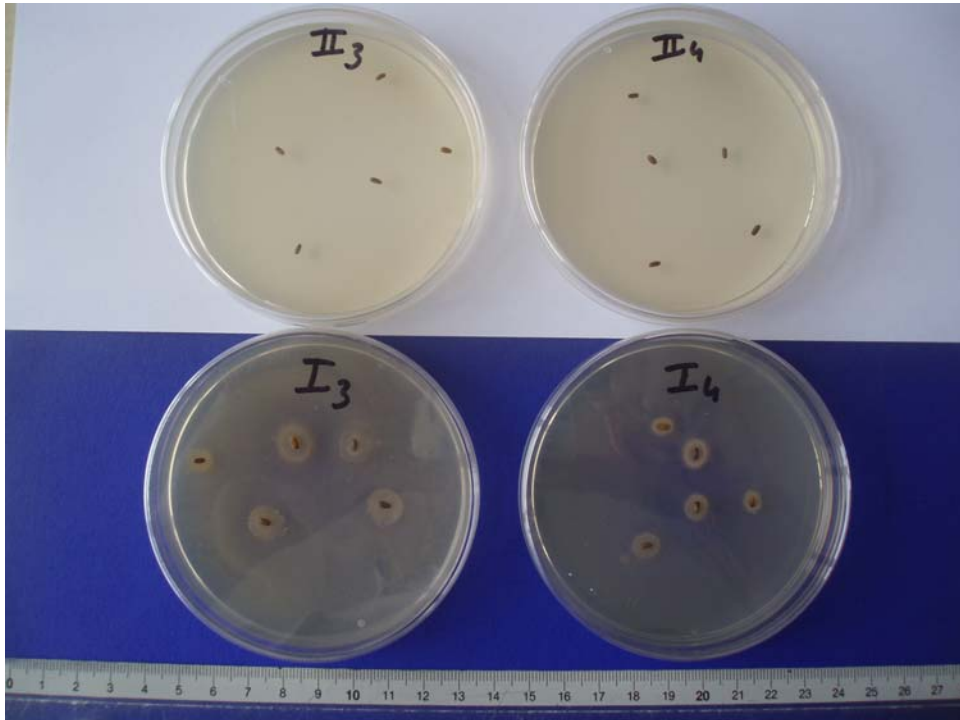


5. Resultaten kweektest

De vier series met de kweektesten zijn ingezet op 21 september. Het blijkt dat de onbehandelde zaden (Blanco) al na 1 dag bacteriekolonies laten zien (5/5, 3/5, 5/5, 5/5, 2/5). Na drie dagen zijn op alle 'blanco' zaden in alle 5 de replica's bacteriekolonies aanwezig (5/5).

Op onderstaande foto 3 zijn de kweekplaten te zien op 30 september 2010. Bij alle drie de series van de ontsmettingsmethodieken zijn geen bacteriekolonies of schimmeldraden te zien. Afgebeeld zijn twee platen uit de blancobehandeling (onder) en twee platen uit de ethanolbehandeling (boven).

Foto 3. Behandelde en onbehandelde zaden



Niettemin na twee weken (5 oktober 2010) zijn enkele bacteriekolonies en schimmeldraden zichtbaar op zaden die wel behandeld zijn. Bij 2/25 zaden uit de ethanolbehandeling en bij 2/25 zaden uit de ethanol-hypochlorietbehandeling zijn beginnende schimmeldraden aangetroffen. Bij de hypochlorietbehandeling zijn zowel schimmeldraden als bacteriekolonies aangetroffen.

In onderstaande tabel zijn de resultaten van de kweektest bij de drie verschillende ontsmettingsmethodieken en de blanco weergegeven na twee weken (5 oktober). In elke replica zijn vijf ontsmette zaden gebruikt.

| Ontsmettingsmethodiek | Kweektest aanwezige micro-organismen (5 oktober 2010) | | | | |
|-----------------------|--|----|----|----|----|
| | Replica 1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| 1. Blanco | 5b | 5b | 5b | 5b | 5b |
| 2. Ethanol | 1s | 1s | 0 | 0 | 0 |
| 3. Ethanol+NaOCL | 0 | 0 | 1s | 1s | 0 |
| 4. NaOCl | 2b | 3s | 2b | 1b | 1b |

b: bacteriekolonies aanwezig op zaadje s: schimmeldraden aanwezig op zaadje b/s: beide aanwezig

In onderstaande tabel zijn de resultaten van de kweektest bij de drie verschillende ontsmettingsmethodieken en de blanco weergegeven na vier en na zes weken (20 oktober en 2 november). De resultaten waren onderling NIET verschillend, dus in één tabel weergegeven. In elke replica zijn vijf ontsmette zaden gebruikt.

| Ontsmettingsmethodiek | Kweektest aanwezige micro-organismen (20 oktober & 2 november 2010) | | | | |
|-----------------------|--|--------------|----|----------|----------|
| | Replica 1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| 1. Blanco | 5b | 5b | 5b | 5b | 5b |
| 2. Ethanol | 1s | 1b, 1s | 0 | 0 | 1b/s |
| 3. Ethanol+NaOCL | 0 | 1s | 1s | 1s | 1s |
| 4. NaOCl | 2b | 1b, 1s, 2b/s | 2b | 3b, 1b/s | 1b, 1b/s |

b: bacteriekolonies aanwezig op zaadje s: schimmeldraden aanwezig op zaadje b/s: beide aanwezig

Conclusie

Uit de bovenstaande resultaten kunnen we concluderen dat de ethanolbehandeling en de gecombineerde ethanol-hypochlorietbehandeling de beste resultaten geven, zij het dat bij beide behandelingen na vier werken 4/25 zaden besmet blijken te zijn.

Overigens hebben we in de literatuur geen vergelijkbare kweektesten op agarplaten kunnen vinden waarbij zeegraszaden zijn gebruikt. Om een 100% kiemvrije zaden te krijgen, lijkt het zinvol na twee weken de ontsmettingsmethodiek nog een keer te herhalen om eventueel resterend gekiemd sporen materiaal te verwijderen.

6. Resultaten kiemingsproef

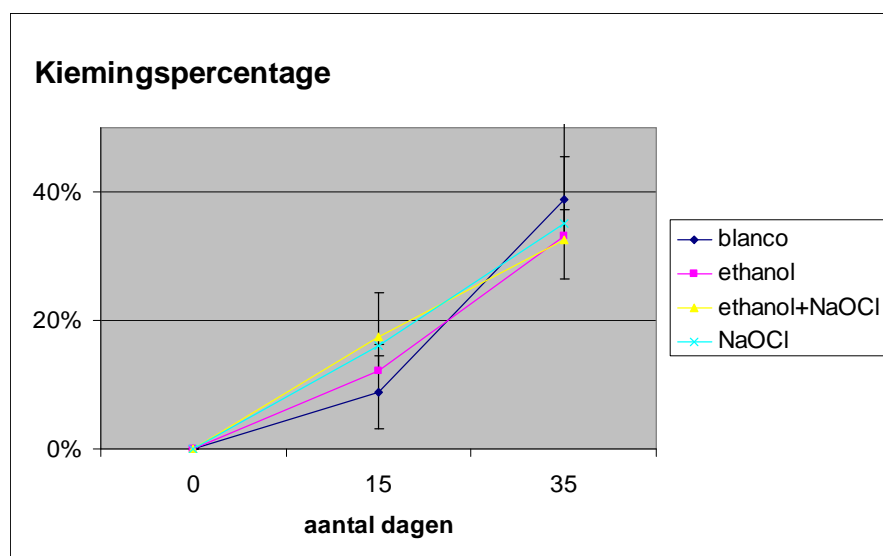
De vier series met de kiemingstesten zijn ingezet op 21 september. Na een dag zijn in alle vier de series de eerst zaden gekiemd. In onderstaande tabellen zijn de resultaten van de kiemingsproef bij de drie verschillende ontsmettingsmethodieken en de blanco weergegeven na twee weken (6 oktober). Het zoutgehalte in het gebruikte zeewater gedurende de eerste twee weken was 20 PSU. In elke replica zijn tussen de 26 en 32 zaden gebruikt. Het definitieve aantal zaden is weergegeven in de tabel: 4/26 betekent 4 van de 26 zaden zijn gekiemd; het getal erachter 15,4 geeft het kiemingspercentage aan.

| Ontsmettings- methodiek | Kiemingspercentage zaden (6 oktober 2010) | | | | | |
|----------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|
| | Replica 1 | R2 | R3 | R4 | R5 | gem. % std |
| 1. Blanco | 4/26 15,4 | 4/28 14,3 | 2/27 7,4 | 1/28 3,6 | 1/28 3,6 | 8,8 ±5,7 |
| 2. Ethanol | 2/27 7,4 | 4/28 14,3 | 3/28 10,7 | 3/28 10,7 | 5/28 17,9 | 12,2 ±4.0 |
| 3. Ethanol+NaOCl | 6/29 20,6 | 3/28 10,7 | 5/26 19,2 | 6/28 21,4 | 5/32 15,6 | 17,5 ±4.4 |
| 4. NaOCl | 2/28 7,1 | 8/28 28,6 | 5/28 17,9 | 5/30 16,7 | 3/29 10,3 | 16,1 ±8.3 |

Op 6 oktober is het zoutgehalte in de petrischaaltjes verlaagd van 20 naar 15 PSU om het kiemingsproces te versnellen. In onderstaande tabel zijn de kiemingsresultaten weergegeven na vijf weken (26 oktober).

| Ontsmettings- methodiek | Kiemingspercentage zaden ingezet (26 oktober 2010) | | | | | |
|----------------------------|---|------------|------------|------------|------------|-------------------|
| | Replica 1 | R2 | R3 | R4 | R5 | gem. % std |
| 1. Blanco | 14/26 53,8 | 13/28 46,4 | 9/27 33,3 | 11/28 39,2 | 6/28 21,4 | 38,9 ±12.4 |
| 2. Ethanol | 10/27 37,0 | 8/28 28,6 | 10/28 35,7 | 8/28 28,6 | 10/28 35,7 | 33,1 ± 4.2 |
| 3. Ethanol+NaOCl | 12/29 41,4 | 7/28 25,0 | 8/26 30,8 | 8/28 28,6 | 12/32 37,5 | 32,7 ± 6.7 |
| 4. NaOCl | 8/28 28,6 | 15/28 53,6 | 9/28 32,1 | 9/30 30,0 | 9/29 31,0 | 35,1 ±10.4 |

Figuur 1. Kiemingspercentages Groot zeegraszaden bij 20 PSU (eerste 2 weken) gevolgd door 15 PSU (laatste 3 weken), bij kamertemperatuur.



Conclusie

Uit de bovenstaande resultaten en de t-toetsen kunnen we concluderen dat het kiemingspercentage ongeacht de behandeling in alle vier de series: de blancobehandeling (1) de ethanolbehandeling (2), de gecombineerde ethanol-hypochlorietbehandeling (3) en de hypochlorietbehandeling (4) NIET significant verschillend is.

7. Risico's van exoten in het Grevelingenmeer en van ziektekiemen voor schelpdierkweek als resultaat van de zeegraszaadproef

Het Grevelingenmeer is aangewezen als Natura 2000 gebied en valt onder het beheerplan Natura 2000 Deltawateren. Herintroductie van Groot zeegras is vergunningplichtig (provincie Zeeland / Zuid-Holland). Bovendien vereist het karakter van de herintroductie met het gebruik van buitenlandse zaden, dat er overleg wordt gevoerd met Team Invasieve Exoten van EL&I.

In Japanse oesters in de Oosterschelde is dit jaar (2010) het oesterherpesvirus (OsHV-1 μ var) gevonden; in het Grevelingenmeer is het virus niet aangetoond. De *Zostera marina* zaden voor het herintroductie experiment in het Grevelingenmeer kunnen worden gehaald uit Frankrijk omgeving Saint Malo (Bretagne). In dit oesterkweekgebied is het herpesvirus aanwezig. Het is daarom zinvol de zaden voor gebruik te ontsmetten, ondanks het feit dat niet bekend is of deze zaden een bron of vector voor virusbesmetting van de oesters kunnen zijn. Ook in de wetenschappelijke literatuur (*web of science*) is hierover geen informatie gevonden.

Er is contact opgenomen met enkele Nederlandse experts op het gebied van exoten en van ziektekiemen met mogelijke risico's voor de schelpdierkweek. Zo is er gesproken met prof. dr. Aad Smaal, verbonden aan IMARES in Yerseke en met drs. Tom van der Have van het Team Invasieve Exoten. Smaal denkt niet dat zaden van *Zostera marina* een bron of vector voor het oestervirus kunnen zijn. Belangrijkste bron is volgens hem de oester zelf die door transport vanuit besmette buitenlandse gebieden naar Nederland worden gebracht. Overigens mogen volgens de EU richtlijn 2006/88/EC er geen ziektedragende (oester)soorten worden overgebracht van een besmet gebied naar een ziektevrij gebied. Van der Have geeft aan dat het onduidelijk is welke eisen de Natura 2000 wetgeving stelt aan de zeegraszaadproef.

Ook is overlegd met dr. Marc Engelsma van het Centraal Veterinair Instituut (CVI) in Lelystad. Hij is deskundige op het terrein van schelpdierziekten en is verantwoordelijk voor de bemonstering van de Japanse oesters in Oosterschelde en Grevelingenmeer. Volgens hem is er geen gevaar voor besmetting van oesters met het oesterherpesvirus door gebruik van zeegraszaden na genomen ontsmettingsmaatregelen. Aanvullend zijn Engelsma drie vragen voorgelegd.

(i) Zijn er lijsten met exoten / ziektekiemen (schimmels, bacteriën, virussen) die bedreigend zijn voor de schelpdierkweek in het Grevelingenmeer?

Er is een OIE-lijst (*World Organisation for Animal Health*) en een EU-lijst met aangifteplichtige ziekten voor aquatische organismen waaronder schelpdieren. Slechts een beperkt aantal van deze ziekteverwekkers is van belang voor de oesterkweek in het Grevelingenmeer; mosselkweek in het Grevelingenmeer is nihil:

- *Bonamia ostreae*, parasiet van de platte oester is sinds 1988 al aanwezig in het Grevelingenmeer (en ook in Bretagne);
- *Bonamia exitiosa*, parasiet van de platte oester, exoot maar recentelijk op verschillende locaties in de EU waargenomen (o.a. Italië, Spanje en Corsica). Voor zover Engelsma weet niet in Bretagne;
- *Mikrocytos mackini*, parasiet van de platte oester, exoot voornamelijk aanwezig in westkust van Canada/USA;
- *Perkinsus marinus*, parasiet van onder andere de Japanse oester, exoot voornamelijk oostkust USA;
- *Marteilia refringens*, een parasiet van de platte oester en mossel. Hoewel de complete cyclus nog niet opgehelderd is gaat men er vanuit dat er een tussengastheerstadium is in enkele soorten copepoden (Wolff 2005). Dit is één van de meest serieuze kandidaten om rekening mee te houden aangezien de geïnfecteerde tussengastheren (copepoden) meegenomen zou kunnen worden

tussen de zaden, en omdat deze parasiet aanwezig is op verschillende locaties in Bretagne en niet in het Grevelingenmeer. In de Oosterschelde en het Grevelingenmeer is de ziekte marteiliosis, die wordt veroorzaakt door *Marteilia refringens* recentelijk niet meer aangetroffen (Engelsma & Haenen 2008).

Naast deze lijst zijn er andere ziekteverwekkers waarvan de introductie zorgelijk is. (1) Het oesterherpesvirus: hoewel de OsHV-1 μ var dit jaar (2010) in de Oosterschelde is aangetoond, zijn er nog geen aanwijzingen dat dit virus ook aanwezig is in het Grevelingenmeer. Wel is het virus in nagenoeg alle kweekgebieden van oesters in Frankrijk aanwezig. (2) *Vibrio* soorten (bacteriën) die problemen kunnen geven in schelpdieren als ziekteverwekker. Deze zijn algemeen voorkomend en Engelsma gaat er vanuit dat de soorten en typen die aanwezig zijn in Bretagne ook in Nederlandse wateren aanwezig zijn. Indien de zaden uit andere regio's dan Bretagne worden gehaald, zal een nieuwe risicoanalyse moeten worden gemaakt.

(ii) Welke exoten / ziektekiemen zijn er nog niet in het Grevelingenmeer, maar wel elders in NW Europa en hebben sporen of kunnen als virus met zaden mee liften?

Bonamia ostreae is al aanwezig in Nederland. *Bonamia exitiosa*, *Mikrocytos mackini* en *Perkinsus marinus* zijn exoten die niet in Bretagne voorkomen. Dus deze zullen alle geen probleem zijn bij het gebruik van zaden van zeegras uit de omgeving van St. Malo. De grootste zorg gaat uit naar de protozo *Marteilia refringens*, welke via copepoden tussen de zaden geïntroduceerd zou kunnen worden, en het al eerder gerefereerde oesterherpesvirus (OsHV-1 μ var).

(iii) Is er kennis van ontsmettingsmethodieken in het algemeen en (zoutwater)plantenzaden in het bijzonder?

In de aquacultuur zijn UV en Ozon veel gebruikte middelen voor ontsmetting van water en worden verschillende chemicaliën gebruikt voor apparatuur. Loog en een middel als *Virkon S* worden veel gebruikt. Drogen werkt vaak goed. Als de zeegraszaden nog levensvatbaar zijn na drogen, zou dit een geschikte manier zijn om mogelijke introductie van ziekteverwekkers te voorkomen. Engelsma kan niet een exacte tijdsduur van drogen geven aangezien de gegevens hiervan voor deze ziekteverwekkers onbekend zijn. Maar op enkele uitzonderingen na (enkele virussen en sporenvormers) is drogen funest voor ziekteverwekkers van aquatische organismen. Na een week drogen (in een stoof bijvoorbeeld) is zijn inschatting dat de kans op OsHV-1 nihil is en zullen eventueel meegekomen copepoden gedood zijn. Dan lijkt een mogelijke transfer van *Marteilia refringens* via deze copepoden naar oesters uitgesloten.

Foto 4. Gedroogde *Zostera marina* zaden



Naast de drie beproefde methodieken is ook een aantal zaden (15) in een vijftal replica's te drogen gelegd bij kamertemperatuur op filterpapier in een open petrischaal. Na twee weken is zeewater (15 PSU) toegevoegd om de kiemkracht te kunnen testen van de gedroogde zaden. Het blijkt dat na vier weken in het zeewater geen van de zaden meer kiemkrachtig is. Hiermee vervalt deze

methode. De zaadschillen laten na de droogperiode een verkleuring zien (lichter) en een donker bruine streep, zie foto 4 op de vorige bladzijde.

8. Algemene conclusies en aanbevelingen

1. Het verzamelen van voldoende (enkele tienduizenden) zeegraszaden in de omgeving van Saint Malo geeft geen logistieke en / of praktische problemen; wel is een en ander afhankelijk van de laagwaterperiode. Na het uitsorteren van de zaden uit de verzamelde bloeiwijzen en een handmatige schoonmaak kunnen de zaden worden bewaard bij 6° Celsius in een 34 PSU zoutwateroplossing. Het kunstmatige zeewater dient elke drie-vier dagen te worden ververs, waarbij slechte zaden of zaden met beginnende schimmeldraden dienen te worden verwijderd.

2. Uit de resultaten van de kiemingsproef kunnen we concluderen dat het kiemingspercentage ongeacht de behandeling in alle vier de series: de blancobehandeling (1) de ethanolbehandeling (2), de gecombineerde ethanol-hypochlorietbehandeling (3) en de hypochlorietbehandeling (4) NIET significant verschillend is.

3. Uit de resultaten van de kweektesten kunnen we concluderen dat de ethanolbehandeling (2) en de gecombineerde ethanol-hypochloriet-behandeling (2) de beste resultaten geven, zij het dat bij beide behandelingen na vier weken 4/25 zaden besmet blijken te zijn. Hierna (6 weken) kwamen er geen nieuwe besmettingen bij. Overigens hebben we in de literatuur geen vergelijkbare kweektesten op agarplaten kunnen vinden waarbij zeegraszaden na een ontsmettingsbehandeling daadwerkelijk zijn getest. Om ziektekiemvrije zaden te krijgen, lijkt het zinvol na twee weken de ontsmettingsmethode nog een keer te herhalen om eventueel resterend gekiemd sporen materiaal te verwijderen. Dit zou getest kunnen worden in een vervolgstudie. Beide ontsmettingsmethodieken zijn met grote hoeveelheden zeegraszaden praktisch en logistiek goed uitvoerbaar.

4. Om definitieve zekerheid te verkrijgen, valt het aan te bevelen om Franse zeegraszaden een keer opzettelijk te besmetten met het oosterherpesvirus (OsHV-1 μ var) en de protozo *Marteilia refringens*. Na deze bewuste besmetting kunnen beide ontsmettingmethodieken (2) en (3) worden toegepast. Zaadschilmateriaal van bewust besmette zaden kan vervolgens in het Centraal Veterinair Instituut met moleculaire detectiemethoden (PCR-testen) worden getest op wel /geen aanwezigheid van het oosterherpesvirus of *Marteilia refringens*.

5. Onduidelijk is vooralsnog welke eisen de Natura 2000 wetgeving stelt aan de zeegraszaadproef. Het is aan te bevelen om tijdig met vergunningverleners van provincie Zeeland / Zuid-Holland en met het Team Invasieve Exoten van het Ministerie van EL&I te overleggen en duidelijkheid te krijgen over de specifieke eisen die de Natura 2000 regelgeving aan deze herintroductieproef stelt.

9. Dankwoord

De auteurs willen graag de volgende personen bedanken. De respondenten van onze vragenlijst op het *Seagrass Forum*; Steef Hanssen en Jytte van Huijstee voor het uitzoeken en schoonmaken van de zeegraszaden; dr Suzanne Haaijer voor haar hulp bij de ontwikkeling van de microbiologische technieken; dr. Marc Engelsma voor zijn bijdrage over potentiële ziektekiemen; prof. dr Aad Smaal, drs. Tom van der Have, dr Rob Leuven voor discussies over invasieve soorten; en drs. Dick de Jong voor zijn commentaar op een eerdere versie van dit rapport.

10. Literatuur

Balestri, E., Piazza, L. Cinelli, F. (1998). In vitro germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 60: 83-93.

Churchill, A. (1992). Growth characteristics of *Zostera marina* seedlings under anaerobic conditions. *Aquatic Botany* 43: 379-392.

- De Jong, D.J., van Katwijk, M.M. , Jager, Z. (2004). Zeegras in Nederland. *De Levende Natuur* 105: 209-211.
- Engelsma, M. & O. Haenen (2008). Jaarverslag schelpdierziekten 2007. Resultaten van onderzoek naar ziekten, plagen en mortaliteiten in het Grevelingenmeer en de Oosterschelde in 2007. CIDC: Lelystad.
- Koch, E. & C. Dawes (1991). Influence of salinity and temperature on the germination of *Ruppia maritima* L. from the North Atlantic and Gulf of Mexico. *Aquatic Botany* 40: 387-391.
- Koch, E. & M. Durako (1991). In vitro studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima*: auxin and cytokinin effects on plant growth and development. *Marine Biology* 110: 1-6.
- Marion, S. & R. Orth (2010). Innovative techniques for large-scale seagrass restoration using *Zostera marina* (eelgrass) seeds. *Restoration Ecology* 18: 514–552.
- Moffler, M. & M. Durako (1984). Axenic culture of *Thalassia testudinum* banks ex König (Hydrocharitaceae). *American Journal of Botany* 71:1455-1460.
- Tanner, C. & T. Parham (2010). Growing *Zostera marina* (eelgrass) from seeds in land-based culture systems for use in restoration projects. *Restoration Ecology* 18: 527-537.
- Werkgroep Infectie Preventie (2009). Beleid, reiniging, desinfectie en sterilisatie. Universitair Medisch Centrum. Leiden.
- Wolff, W. (2005). Non-indigenous marine and estuarine species in The Netherlands. *Zoologische Mededelingen* 79: 1-116.
- Zarranz, M.E., Gonzalez-Henriquez, N., Garcia-Jimenez, P., Robaina, R.R. (2010). Restoration of *Cymodocea nodosa* seagrass meadows through seed propagation: germination *in vitro*, seedling culture and field transplants. *Botanica marina* 53:173-181.

Bijlage: Gebruikte methodieken voor ontsmetting van zeegraszaden

Dr. Eva Koch (Verenigde Staten)

In our paper (Koch & Durako 1991) for micro propagation of *Ruppia maritima* we describe a mechanism to disinfect meristems. We have used the same method for seeds. It is very simple with a series of rinses in bleach (10 % Clorox) and fungicide and soaking in antibiotics.

Dr. Rob Hughes (Verenigd Koninkrijk)

Mark Emmerson sterilized *Spartina* seeds with 5% sodium hypochlorite (after Marks & Truscott 1985). Another project student has a reference to alternately washing *Zostera* seeds in 96% ethanol and distilled water (after Koch & Dawes 1991).

Dr. Sandy Wyllie-Echeverria (VS)

We stored captured *Zostera marina* seeds in fresh seawater (25–30 PSU) in the dark, at approximately 5° C, until seed metrics were measured. Seed batches were surface-sterilized before storage. The seeds were blotted dry, surface sterilized for 20 min in a Clorox-sterile seawater solution (25% Clorox, The Clorox Co., Oakland, CA, USA) followed by four washes with sterile seawater (after Churchill 1992).

Dr. Michael Durako (VS)

We used a surface disinfestations technique to establish axenic seedlings of *Thalassia testudinum*. You may have to adjust incubation times, concentrations of Clorox and which antibiotics to use for a particular species (after Moffler & Durako 1984).

Dr. Bob Orth (VS)

As far as I know, most people have used a mild bleach solution but I don't think they ever showed its overall effectiveness. When we hold our seeds in recirculating systems we do not subject them to a bleach solution. We have found an unusual bacterium build up (a whitish coating over the seeds) but it does not seem to harm the *Zostera marina* seeds. The bacteria seem to thrive on organic material that we cannot sieve from the seed material (after Orth & Marion 2007, Marion & Orth 2010).

Dr. Anitra Thorhaug (VS)

Infections come because there are too many *Zostera marina* seeds together without running seawater. Clean the seeds and throw out the ill ones. Look at the seeds every day or every other day and with a colander wash them under running fresh water. I take it you are planting these seeds. Otherwise, if using for experiments, then using a glove box to get axenic seeds from using alcohol on the seed pod.

Dr. David Merrit (Australië)

I was playing around a little with germination for a few months, but not really anything very serious. I was sterilising the *Posidonia* seeds with a mild sodium hypochlorite solution (1 - 2%) which worked ok.

Dr. Eric Bunn (Australië)

Seeds can be sterilized with about 2% sodium hypochlorite + a small amount of surfactant (e.g. 0.5-1 ml/L tween-80) for about 15-20 mins. Followed by rinsing in sterile distilled water two or three times. The seeds can then be extracted aseptically with a forceps and scalpel in a laminar flow. Rinsing the seeds in 80% ethanol for several minutes prior to sterilization in hypochlorite may assist in removing adhering contaminating microbes. As long as the seeds coats haven't split. If you are worried just reduce the time of exposure to ethanol to about 30-60 sec. For large seeds with fairly thick seed capsules (e.g. *Posidonia*) the time of exposure is not such a problem but you may have to experiment with smaller seeded species.

Op basis van een gerichte literatuur zoekopdracht op het ISI Web of Knowledge zijn nog drie aanvullende referenties naar zeegraszaden ontsmettingsmethodieken gevonden.

Dr. Elina Balestri (Italië)

Fruits of *Poso donia* were surface-sterilized by rinsing in ethanol 70% v/v for 2 min, followed by immersion in 1.5% sodium hypochlorite in filtered, autoclaved seawater at pH 7.8 for 30 min. The fruits were then cut in half and the seeds removed aseptically and measured using a dissecting microscope. Seeds of homogeneous size and general morphology were selected (after Balestri et al. 1998).

Dr. Christopher Tanner (VS)

Visual inspection under a dissecting scope was used to remove nonviable seeds of *Zostera marina* prior to the beginning of small-scale germination and growth experiments. Seeds were judged to be viable if they had intact seed coats and were firm when gently squeezed with forceps. Seeds were surface sterilized by soaking in 1% Na hypochlorite for 5 minutes, followed by 3 rinses in sterile estuarine water (after Churchill 1992, Tanner & Parham 2010).

Dr. Maite Zarranz (Spanje)

To prevent overgrowth by epiphytes, *Cymodocea* seeds were gently cleaned with a tooth brush and then submerged for 10 min in a 10% (v/v) commercial bleach solution made up in autoclaved seawater (a drop of Tween 80 was used as surfactant). Seeds were then washed three times in autoclaved seawater (after Zarranz et al. 2010).