



Aquatische exoten vroeg detecteren via eDNA

environmental DNA
invasieve exoten
rivierkreeften
validatie
detectiegrens

Case study rivierkreeften

Aquatische exoten laten kleine hoeveelheden DNA achter in hun leefmilieu, zogenaamd environmental DNA of eDNA. Daarmee kan de aanwezigheid van bepaalde exoten op een eenvoudige manier (analyse van water-monsters) worden aangetoond. Environmental DNA-detectiemethoden zijn echter nog volop in ontwikkeling. Aan de hand van exotische rivierkreeften laten we zien wat er komt kijken bij de ontwikkeling en validatie van een nieuwe eDNA-detectiemethode en bij het daadwerkelijk gebruiken van dergelijke methoden.

Waterbeheerders hebben te maken met een toenemende diversiteit en verspreiding van invasieve exoten: niet-inheemse soorten die zich weten te vestigen en zich snel vermeerderen (NVWA, 2014). Rivierkreeften zijn hiervan een sprekend voorbeeld. In relatief korte tijd is het aantal invasieve kreeftensoorten in Nederland toegenomen tot zeven, waaronder de rode Amerikaanse rivierkreeft (*Procambarus clarkii*), figuur 1, één van de beruchtste in Europa. Deze rivierkreeft kan aanzienlijke schade toebrengen aan lokale ecosystemen door de vegetatie te verwoesten en te graven in oevers (Roessink et al., 2010). Andere rivierkreeften kunnen vergelijkbare problemen opleveren (Roessink et al., 2009). Aangezien de toegebrachte schade kan resulteren in een lagere ecologische waardering binnen de Kaderrichtlijn water (zie Van der Meulen et al., 2009), zijn waterbeheerders de kreeften liever kwijt dan rijk.

Het Nederlandse exotenbeleid (LNV, 2007) heeft als uitgangspunt om introductie van exoten in de natuur te voorkomen, en als dat mislukt over te gaan tot verwijdering zolang de populaties nog klein en beheersbaar zijn. Dit vereist een vroegtijdige signalering. Een systeem om ook populaties met lage dichtheden aan te tonen was echter voor rivierkreeften tot nu toe nog niet beschikbaar. Monitoring vindt momenteel voornamelijk plaats via vangst (vallen of fuiken) en zichtwaarnemingen. Deze methoden zijn zeer arbeidsintensief.

Efficiënter speuren

Opsporing op basis van DNA-sporen biedt de mogelijkheid om sterk te besparen op de metingen die nodig zijn voor veldwerk (Darling & Mahon, 2011). Vanaf de waterkant kan betrekkelijk snel een aantal watermonsters worden genomen, die vervolgens in een genetisch laboratorium worden gescreend op het DNA van de doelsoort. Deze laboratoriumanalyse kan simultaan worden uitgevoerd voor een groot aantal monsters, zodat er meer tijd en geld wordt uitgespaard naar mate het aantal monsterlocaties toeneemt. Een tweede voordeel is dat identificatie op basis van uiterlijke kenmerken niet langer noodzakelijk is en veldwerk dus kan worden uitgevoerd door mensen zonder gerichte taxonomische kennis. Daarnaast is het niet langer nodig om dieren te vangen, of zelfs maar het water in te gaan. Dit voorkomt niet alleen onnodige verstoring van kwetsbare leefmilieus, maar ook de mogelijke overdracht van pathogenen, zoals de kreeftenpest. Een ander belangrijk voordeel van eDNA-detectietechnieken is de vaak hogere kans op detectie ten opzichte van conventionele methoden (Jerde et al., 2011; DeJean et al., 2012). Dit geldt met name bij lage dichtheden van de doelsoort (figuur 2), wat de methode uitermate geschikt maakt voor vroegtijdige opsporing van exoten.

Een goede eDNA-detectiemethode kan het werk van onderzoekers en beheerders dus aanzienlijk vergemakkelijken, maar de techniek is nog jong en wordt pas sinds

ARJEN DE GROOT,
IVO LAROS,
FABRICE OTTBURG &
IVO ROESSINK

Dr. G.A. de Groot Alterra,
Wageningen UR, Postbus 47,
6700 AA Wageningen
g.a.degroot@wur.nl
Ing. I. Laros Alterra,
Wageningen UR
F.G.W.A. Ottburg BSc
Alterra, Wageningen UR
Dr. Ir. I. Roessink. Alterra,
Wageningen UR

Figuur 1 Rode Amerikaanse rivierkreeft (*Procambarus clarkii*). Foto Fabrice Ottburg.

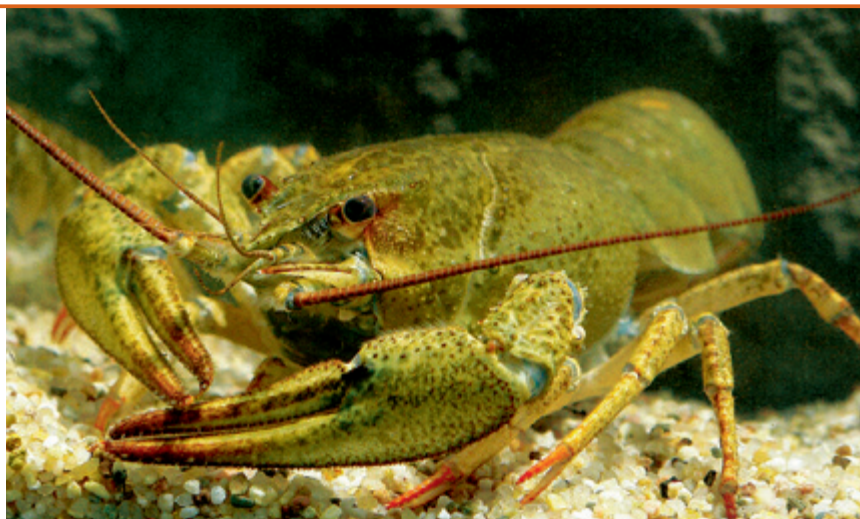


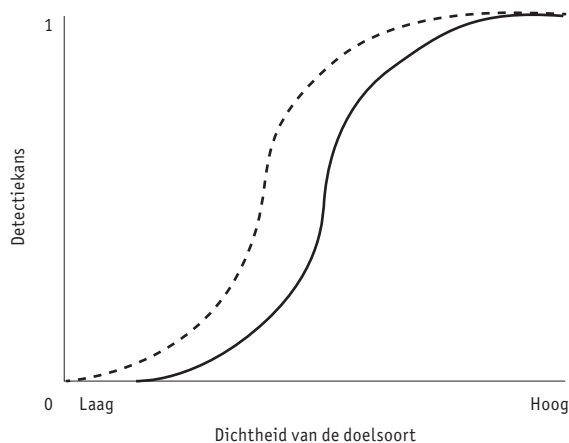
Foto **Fabrice Ottburg**
Turkse rivierkreeft
(*Astacus leptodactylus*).

Photo **Fabrice Ottburg**
Turkish crayfish (*Astacus
leptodactylus*).

Figuur 2 theoretisch
model van de detectiekans
van conventionele (dichte
lijn) en eDNA-gebaseerde
(gestippelde lijn) monito-
ringstechnieken bij ver-
schillende dichtheden van
de doelsoort. Naar: Darling
& Mahon, 2011.

Figure 2 theoretical
model of the variation in
detection rates between
conventional (solid line)
and eDNA-based (dotted
line) monitoring methods,
in relation to the popula-
tion density of the target
species. Based on: Darling
& Mahon, 2007.

kort in de praktijk toegepast. De technische en prakti-
sche hobbels die moeten worden genomen om een der-
gelijke methode te ontwikkelen en toe te passen moe-
ten niet worden onderschat. In dit artikel gaan we hier
verder op in.



Een nieuwe eDNA-methode

Een eDNA-gebaseerde detectiemethode bestaat op
hoofddlijnen uit drie stappen:

- **monsterafname**

Wanneer betrekkelijk kleine en langzaam stromen-
de wateren worden onderzocht (sloten, kleine meer-
tjes), kan worden volstaan met een klein monstervolu-
me van ca. 15 ml, zie figuur 3 en Ficetola et al. (2008).
Rivierkreeften worden echter ook in de grotere en snel-
ler stromende wateren aangetroffen, waar door continue
verdunding de concentratie eDNA aanmerkelijk lager zal
liggen. Een optie is dan om grotere volumes (5-20 liter)
te bemonsteren en deze vervolgens te filtreren. Omdat
zowel de doelsoort als diens DNA niet per definitie ge-
lijkmatisch verspreid is over de watermassa, worden stan-
daard per locatie meerdere monsters genomen (Ficetola
et al., 2008). Over de optimale balans tussen het aan-
tal monsters en het monstervolume bestaat vooralsnog
geen overeenstemming, maar deze balans varieert per
soort en monsterlocatie. Bemonsteringsmaterialen zijn
steriel verpakt en worden maar één keer gebruikt om
kruisbesmetting met DNA uit andere monsters/locaties
te voorkomen.

- **DNA-extractie**

Environmental DNA betreft in feite een verzamelterm
voor DNA dat los van het organisme in het milieu rond-
zwerft. Hierbij kan sprake zijn van intacte cellen die
meekomen met uit-/afscheidings als urine, feces en
slijm, maar ook van DNA opgelost in het water. De ex-
tractie van DNA vindt plaats in een laboratorium en
dient om het DNA vrij te maken, te concentreren en te
ontdoen van ongewenste stoffen. Voorkomen van kruis-
besmetting is ook in dit stadium weer cruciaal.

- **detectie van DNA van de doelsoort(en)**

De spil van alle DNA-detectiemethoden is het gebruik van
een zogenaamde genetische merker, een specifiek DNA-

fragment dat uniek is voor de doelsoort(en). Wanneer een dergelijk fragment bekend is, kan een laboratoriumtest worden ontwikkeld die alleen het DNA van dit specifieke fragment vermenigvuldigt (via een *polymerase chain reaction*, ofwel PCR) tot een detecteerbare hoeveelheid. Voor deze detectie bestaan verschillende technieken. De meest makkelijke is de gelmethode die het DNA kleurt en zichtbaar maakt op een agarosegel. Kwantitatieve PCR (qPCR) kwantificeert de hoeveelheid DNA (doet de gelmethode niet), kan lagere hoeveelheden DNA detecteren en geeft een lagere kans op kruisbesmetting.

Case: merkers voor rivierkreeften

Veruit de meeste in de wetenschappelijke literatuur beschreven eDNA-methoden voor aquatische organismen richten zich op vertebraten, vooral vissen of amfibieën. Deze groepen produceren veel slijm en daarmee veel eDNA. In een enkel geval is geprobeerd, met wisselend effect, zoogdieren (otter, waterspitsmuis) te bemonsteren (Thomsen et al., 2012; Herder et al., 2013). Het aantal succesvolle methoden voor invertebraten, zoals de kreeftachtigen, is tot nu toe zeer beperkt.

Binnen het experiment 'kleine innovatieve projecten voor de groenblauwe ruimte' (Bregt et al., dit nummer) ontwikkelden de auteurs in 2013 twee merkersystemen voor rivierkreeften, gericht op verschillende toepassingen. Het eerste merkersysteem (hier aangeduid met Pc) is soortspecifiek: het heeft tot doel om slechts één soort aan te tonen, de rode Amerikaanse rivierkreeft (*Procambarus clarkii*). Daarnaast werd een tweede merkersysteem ontwikkeld (AO), gericht op detectie van de rivierkreeftgeslachten *Astacus* en *Orconectes*. Voor de exacte procedure van het ontwikkelingstraject en de technische karakteristieken van de ontwikkelde merkers verwijzen we naar De Groot et al. (in voorbereiding).



Aanvullend op het bovengenoemde experimentele programma, werken we momenteel nog aan algemene merkers voor de geslachten *Procambarus* en *Pacifastacus*, met als doel te komen tot een brede test die alle in Nederland bekende rivierkreeften kan aantonen.

Naast het ontwerpen van nieuwe merkersystemen is binnen het experiment 'kleine innovatieve projecten voor de groenblauwe ruimte' ook aandacht besteed aan de verificatie van de juiste werking ervan. Een dergelijk validatietraject is een cruciaal, maar vaak onderschat, onderdeel van de methodeontwikkeling. Het validatietraject richt zich op twee zaken: (1) het vaststellen of inderdaad een positief resultaat wordt verkregen in geval van zekere aanwezigheid van de doelsoort, en (2) het uitsluiten van een vals-positief resultaat als de doelsoort in werkelijkheid ontbreekt. Een vals-positieve score kan

Figuur 3 bemonstering van eDNA. Foto: Ivo Laros.

Figure 3 sampling of eDNA. Photo: Ivo Laros.

worden veroorzaakt door een merkersysteem dat onvolgende specifiek is en een positief resultaat geeft voor een sterk vergelijkbaar DNA-fragment van één of meer nauw verwante soorten. Om het risico hierop in te schatten zijn de ontwikkelde merkers getest op een mix van DNA-extracten van zoveel mogelijk andere in Nederland voorkomende kreeftachtigen (onder meer waterpissebed, watervlokreeft en Chinese wolhandkrab). Het testresultaat was negatief voor beide merkers, wat aangeeft dat vals-positieve resultaten niet optraden. Het verifiëren van de werking op de doelsoort zelf is complexer. Zelfs als de analyse werkt op DNA van de doelsoort, kunnen diverse factoren de uiteindelijke detectiekans negatief beïnvloeden. Naast het falen van de analyse zelf (mislukte DNA-extractie of incorrect PCR-protocol), kunnen bepaalde stoffen de vermenigvuldiging van het DNA remmen of kan überhaupt geen DNA van de doelsoort in het monster terechtkomen. Om een indruk te krijgen van de detectiekansen werden in september en oktober 2013 in acht wateren monsters van 15 ml genomen. Vier van deze wateren herbergen bekende populaties van de rode Amerikaanse rivierkreeft. Tests met merkersysteem Pc waren positief voor alle geanalyseerde monsters uit drie van deze wateren (tabel 1). Het vierde monsterpunt, gelegen aan de rand van de Loosdrechtse Plassen (totale oppervlakte: 1200 ha), scoorde negatief. Gezien het geringe monstervolume is

dit niet verbazingwekkend, en filtratie van een groter volume biedt hier mogelijk uitkomst. Merkersysteem AO is getest op monsters van drie locaties waar achtereenvolgens *A. astacus*, *A. leptodactylus* en *O. virilis* zijn waargenomen. Voor alle drie locaties waren alle geteste monsters positief.

Huidige toepasbaarheid

Het hierboven beschreven traject van ontwikkeling en validatie is de afgelopen jaren door wetenschappers wereldwijd doorlopen. Voor diverse aquatische soorten heeft dit geresulteerd in een werkende methode: de merkers kunnen DNA van de doelsoort oppikken uit watermonsters en werken niet op DNA van andere soorten. Een positieve score wijst er dus met grote zekerheid op dat de soort ter plaatse aanwezig is (geweest). Een praktische vraag is echter wel of hij er zelf nog altijd zit, of dat alleen zijn DNA is overgebleven. Lastiger is het om met zekerheid te bepalen dat de soort niet aanwezig is. Evenals bij monitoring op basis van vangst of zicht is dit waarschijnlijk nooit met 100% zekerheid te zeggen en ook de kans op detectie is zelden 100%. Voor potentiële gebruikers van eDNA-methoden is het zeer relevant om te kunnen inschatten hoeveel monsters genomen moeten worden van welk volume en hoe vaak de laboratoriumtest gerepliceerd moet worden, om zo betrouwbaar mogelijk te kunnen vaststellen of de soort

Tabel 1 overzicht van bemonsterde locaties, met detectieresultaat (aantal positieve monsters ten opzichte van totaal aantal monsters). Pc = getest met merkersysteem voor *P. clarkii*; AO = getest met merkersysteem voor de in Nederland waargenomen soorten uit de geslachten *Astacus* en *Orconectes*.

Table 1 overview of sampled locations per target species, with detection results (positive/total tests). Pc = marker for *P. clarkii*; AO = marker for genus *Astacus* and *Orconectes*.

Merkersysteem	Monsterlocatie	Type locatie	Aanwezige soort	Resultaat
Pc	Naardermeer	Ven	<i>Procambarus clarkii</i>	2/2 (100%)
	Maarsseveen	Sloot		2/2 (100%)
	Loosdrechtse Plassen	Meer		0/2 (0%)
	Waddinxveen	Sloot		3/3 (100%)
AO	Sinderhoeve	Sloot	<i>Astacus astacus</i>	2/2 (100%)
	Kerkrade	Stuwmeer	<i>Astacus leptodactylus</i>	3/3 (100%)
	Kamerik	Wetering	<i>Orconectes virilis</i>	2/2 (100%)

wel of niet aanwezig is. Een antwoord op deze praktijkvragen vereist een degelijk inzicht in de manier waarop de detectiekans varieert onder verschillende omstandigheden. Het aantal wetenschappelijke artikelen over dit onderwerp is nog zeer beperkt. Tot nu toe richtten onderzoekers zich voornamelijk op proeven met dieren in aquariumtanks (onder meer Thomson *et al.*, 2012). Langs deze weg is onder andere duidelijk geworden dat het na het verdwijnen van de doelsoort minimaal één dag tot maximaal twee weken duurt voordat geen eDNA meer wordt gedetecteerd. De huidige kennis is echter gefragmenteerd: verschillende onderzoeksvragen zijn beantwoord voor verschillende soorten, en zelden is er onder natuurlijke omstandigheden gewerkt. Informatie over hoe verschillen tussen soorten of watercondities de detectiekans beïnvloeden is derhalve (nog) slechts sporadisch beschikbaar.

Verskillende factoren beïnvloeden de eDNA-concentratie op een willekeurige plek in de watermassa (en dus in een ter plekke genomen monster), zoals de mate waarin de doelsoort DNA aan het water afgeeft. Dit hangt onder meer af van de productie van slijm en uitwerpselen, en de tijd die het organisme doorbrengt in het water. Algemeen wordt aangenomen dat eDNA zich vervolgens gelijkmatig in het water verdeelt, maar klimatologische condities (temperatuur, wind), binding aan zwevend stof en de bewegelijkheid van de doelsoort zullen van invloed zijn op de snelheid van homogenisatie (Levy-Booth *et al.*, 2007). Dezelfde factoren, evenals de chemische en microbiële samenstelling van het water, zullen ook van invloed zijn op de afbraaksnelheid van het eDNA. Weer andere factoren beïnvloeden de kans dat een bepaalde eDNA-concentratie in het watermonster ook daadwerkelijk kan worden gesignaleerd. Met name opgeloste humuszuren (rijkelijk aanwezig in veenwateren), maar ook het DNA van andere soorten, kunnen de

vermeerderingsreactie verstoren. Onze ervaring leert dat verdunnen van het DNA-extract in deze gevallen succesvoller is dan het vergroten van het monstervolume.

Van kwalitatief naar kwantitatief?

Een voordeel van monitoring via vangstmethoden is dat het niet alleen inzicht geeft in de aanwezigheid van de soort, maar ook in de aantallen waarin de soort aanwezig is. De toepasbaarheid van eDNA-technieken zou dan ook aanmerkelijk worden vergroot indien de uitslag ook inzicht kan geven in de lokale populatiedichtheid. Onder meer Thomsen *et al.* (2012) toonden aan dat de hoeveelheid gedetecteerd DNA in een aquarium toenam met het aantal exemplaren dat was toegevoegd. Echter, zolang nog onduidelijk is welke factoren in natuurlijke watersystemen de eDNA-concentratie op een bepaalde locatie bepalen, is het zeer lastig om in het laboratorium bepaalde relaties tussen de eDNA-concentratie en de populatiedichtheid op de juiste manier te duiden. Onduidelijk blijft bijvoorbeeld over welk watervolume rond het monsterpunt een uitspraak kan worden gedaan, in hoeverre de aanwezigheid van een enkel individu vlak naast het monsterpunt eenzelfde concentratie oplevert als een groep individuen op grotere afstand en hoe de activiteit van dieren gedurende het seizoen de afgifte van eDNA bepaalt (meer activiteit gedurende het paarseizoen versus minder activiteit in de winter). Naar onze mening zijn eDNA-methoden voor het schatten van populatiegroottes (en dus het vaststellen of lokaal een duidelijke kernpopulatie aanwezig is) op dit moment nog niet ver genoeg doorontwikkeld.

Hoe nu verder?

Bij elke nieuwe techniek speelt de vraag wanneer deze afdoende is getest om over te gaan tot praktijktoepassing. Een validatietraject zoals hierboven beschreven



Foto **Rudmer Zwerver**
Saxifraga.nl. Rode
Amerikaanse rivierkreeft
(*Procambarus clarkii*).

voor de rivierkreeftmethoden is daarvoor naar onze mening essentieel. Daarbij zal er in ieder geval ook getest moeten worden op een reeks lokale watersystemen waar de soort wel en niet is waargenomen, om er zeker van te zijn dat de methode functioneert onder de tijdens de monitoring geldende omstandigheden. Voor een aantal Nederlandse doelsoorten, waaronder naast de knoflookpad, kamsalamander en grote modderkruiper nu

ook de rode Amerikaanse rivierkreeft, is dit traject doorlopen en is de tijd rijp voor implementatie. Nu duidelijk is dat eDNA-detectie niet alleen tijd en kosten kan helpen besparen, maar ook succesvoller is dan conventionele inventarisatiemethoden – het aantal vondsten van de doelsoort ligt vaak aanmerkelijk hoger (onder meer Jerde *et al.*, 2011; DeJean *et al.*, 2012) – lijkt het logisch om deze techniek op zijn minst ondersteunend te gaan inzetten.

Op basis van de huidige kennis kunnen we concluderen dat eDNA-technieken weliswaar een degelijke voorbereiding behoeven, maar vervolgens zeer veelbelovend zijn. Een volledig beeld van de (on)mogelijkheden is echter nog niet beschikbaar en om dit te verkrijgen zal een investering in fundamenteel onderzoek nodig zijn. Verdere praktijktoepassing en gecontroleerde experimenten zijn manieren om gaandeweg meer kennis te vergaren over zowel de kwantitatieve mogelijkheden van de techniek als de verschillen in detectiekans bij verschillende soorten, levenstadia, seizoenen, weerscondities en watertypen. Zo kan bemonstering op verschillende tijdstippen en afstanden van een kooi met daarin de doelsoort meer inzicht geven in de verspreidingssnelheid van eDNA in natuurlijke wateren.

Summary

Efficient detection of aquatic organisms via eDNA

Arjen de Groot, Ivo Laros, Fabrice Ottburg & Ivo Roessink
eDNA, invasive species, validation, detection limit

To avoid damage to local ecosystems, water managers spend substantial efforts to monitor the spread of invasive species. eDNA-based detection methods potentially

allow much more efficient monitoring, as species can be detected based on simple water samples. Currently, however, such methods are still highly innovative, and much remains unknown about their practical limits. In this paper, we use a case study for two newly developed eDNA-based detection methods for invasive crayfish, to illustrate the current state of the art in this field of study. Environmental DNA methods can yield significantly higher detection rates compared with conven-

tional monitoring methods and well-validated methods for a number of aquatic species are now ready for application in Dutch monitoring schemes. Yet, at the same time we need to gain more knowledge on the variation of detection rates both among species and water types.

To acquire such knowledge, we urge for 1) the application of validated eDNA-methods in Dutch monitoring programs and 2) more experimental research on factors that affect detection rates.

Literatuur

- Bregt, A.K., J. Bouma & H.P. Wolfert, dit nummer.** Kleinschalige innovaties voor de groenblauwe ruimte. Landschap 2014/3: 109-115.
- Darling, J.A. & A.R. Mahon, 2011.** From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Ecological Research* 111: 978-988.
- DeJean, T., A. Valentini, C. Miquel, P. Taberlet, E. Bellemain & C. Miaud, 2012.** Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49: 953-959.
- Ficetola, G.F., C. Miaud, F. Pompanon & P. Taberlet, 2008.** Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4: 423.
- Groot, G.A. de, I. Laros, F.G.W.A. Ottburg & I. Roessink, in voorbereiding.** Molecular based detection of invasive crayfish.
- Herder, J., D. Bekker, R. Koelman & E. Bellemain, 2013.** Met eDNA op het goede spoor. *Zoogdier* 24: 8-10.
- Jerde, C.L., A.R. Mahon, W.L. Chadderton & D.M. Lodge, 2011.** Sight-unseen; Detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4, 150-157.
- Levy-Booth, D.J., R.G. Campbell, R.H. Gulden, M.M. Hart, J.R. Powell, J.N. Klironomos, C.J. Swanton, J.T. Trevors & K.E. Dunfield, 2007.** Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil BiolBiochem* 39:2977-2991.
- LNV, 2007.** Beleidsnota invasieve exoten. Den Haag. Ministerie van LNV.
- Meulen, M. van der, J. Vos, W. Verweij & M. Kraak, 2009.** Effecten van exotische rivierkreeften op de KRW-maatlatscores. *H2O* 42: 41-43.
- NVWA, 2014.** Invasieve exoten. Webpagina: <https://www.vwa.nl/onderwerpen/ongewenste-uitheemse-planten/dossier/invasieve-exoten> (bezoekt: 15 augustus 2014).
- Roessink, I., S. Hudina & F.G.W.A. Ottburg, 2009.** Literatuurstudie naar de biologie, impact en mogelijke bestrijding van twee invasieve soorten: de rode Amerikaanse rivierkreeft (*Procambarus clarkii*) en de geknobbelde Amerikaanse rivierkreeft (*Orconectes virilis*). Wageningen. Alterra.
- Roessink, I., J. van Giels, A. Boerkamp & F.G.W.A. Ottburg, 2010.** Invloed van de rode Amerikaanse rivierkreeft (*Procambarus clarkii*) en de geknobbelde Amerikaanse rivierkreeft (*Orconectes virilis*) op waterplanten en waterkwaliteit. Wageningen. Alterra.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T.P. Gilbert, L. Orlando & E. Willerslev, 2012.** Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *MolecularEcology* 21: 2565-2573.