



Jelger Herder, Stichting RAVON

Alice Valentini, Spygen

Jan Kranenbarg, Stichting RAVON

# Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA

**In oktober 2008 presenteerde een Franse onderzoeksgroep de ontdekking van Environmental DNA (afgekort eDNA): een nieuwe inventarisatiemethode gebaseerd op de detectie van DNA dat soorten die in het water leven, achterlaten. Door watermonsters te analyseren op de aanwezigheid van DNA is het voorkomen van soorten vast te stellen. RAVON zag in de methode een grote potentie voor het inventariseren van lastig te detecteren soorten. Vorig jaar voerde de stichting voor onderzoek naar reptielen, amfibieën en vissen samen met de Franse partnerorganisatie Spygen een succesvolle pilot uit voor het gebruik van eDNA voor het detecteren van grote modderkruipers. Op zeven van de acht locaties werden die met behulp van eDNA aangetoond (trek kans 87,5 procent). Environmental DNA blijkt betrouwbaarder en nauwkeuriger dan traditionele methoden en bovendien kostenefficiënter.**

Zoet water behoort tot één van de meest bedreigde habitats ter wereld. Om de continue achteruitgang van de ecologische waterkwaliteit en de achteruitgang van soorten en hun habitats tegen te gaan, riep de Europese Unie de Kaderrichtlijn Water en de Habitatrichtlijn in het leven. Daarnaast kent Nederland de Flora- en faunawet voor de bescherming van soorten. De waterschappen, provincies en Rijkswaterstaat stemmen hun beleid en beheer af op de genoemde richtlijnen en evalueren de effecten hiervan door de waterkwaliteit en het voorkomen van beschermde soorten te monitoren.

De grote modderkruiper (*Misgurnus fossilis*) is een zeldzame vis die is opgenomen in bijlage II van de Habitatrichtlijn en tabel 3 van de Flora- en faunawet. Door de verborgen levenswijze<sup>1)</sup> is deze soort lastig te inventariseren. De soort komt voor in ondiepe, vaak verlandende sloten en wateren en vlucht bij gevaar de bodem of dichte vegetatie in. De trek kans bij een éénmalig bemonstering met traditionele onderzoeksmethoden zoals het schepnet, elektrisch vissen of fuiken, is relatief laag<sup>2)</sup>, zeker als de soort in lage dichtheden voorkomt.

In dit artikel presenteren we een nieuwe detectiemethode: Environmental DNA (afgekort eDNA). Deze methode is gebaseerd

op het feit dat elk organisme dat in het water leeft, hierin kleine stukjes DNA achter laat via feces, urine en huidcellen. Door het unieke oplossende vermogen van water worden deze stukjes DNA verspreid over een groot oppervlak. Door watermonsters te verzamelen en te analyseren op de aanwezigheid van DNA kan het voorkomen van een doelsoort zoals de grote modderkruiper worden aangetoond. In 2008 is deze methode voor het eerst beschreven en succesvol toegepast bij Amerikaanse brulkickers<sup>3)</sup>. Aanvullend onderzoek toonde aan dat vrij in het water aanwezig DNA binnen drie weken afbreekt. Detectie van eDNA in watermonsters wijst dus op een recente aanwezigheid van de doelsoort<sup>4)</sup>.

In 2011 voerde RAVON samen met het Franse onderzoeksbureau Spygen - als onderdeel van het Meetnet Beek- en Poldervissen van het Netwerk Ecologische Monitoring - een pilot uit in Nederland waarbij de Environmental DNA-methode is getest voor de grote modderkruiper<sup>5)</sup>.

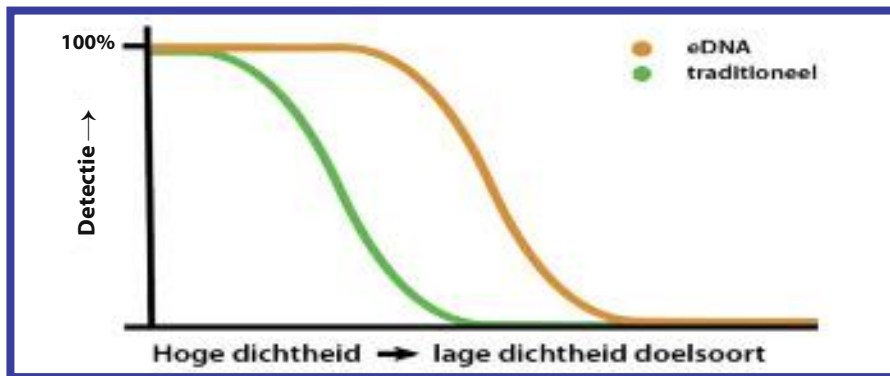
## Werkwijze

**Ontwikkeling van soortspecifieke primers**  
Voor het aantonen van de aanwezigheid van eDNA in een watermonster wordt gebruik gemaakt van soortspecifieke primers: kleine stukjes DNA-code die enkel hechten aan het DNA van de doelsoort. Vervolgens wordt via

een Polymerase Chain Reactie (PCR) alleen dat DNA vermenigvuldigd dat gebonden is aan de primers. Na vermeerdering via de PCR wordt het product aangebracht op een gel waarop enkel indien de soort aanwezig is een streepje zal verschijnen (positieve PCR-reactie). Het ontwikkelen van goede primers die enkel aan de doelsoort hechten

## Grote modderkruiper.





## Voordelen

- hogere detectiekans: Environmental DNA is veel gevoeliger dan traditionele bemonsteringsmethoden, met name bij lage dichtheden en moeilijk te detecteren doelsoorten (zie grafiek);
- kostenefficiënt: het bemonsteren vraagt veel minder tijd dan de traditionele methode;
- nauwkeuriger: door soortspecifieke primers zijn determinatiefouten uitgesloten;
- geen verstoring: voor het aantonen van een kwetsbare soort hoeft deze niet gevangen te worden.

Deze grafiek toont schematisch de kans op detectie met traditionele methoden (groen) en Environmental DNA (oranje) bij een afnemende dichtheid van de doelsoort. Bij lagere dichtheden neemt de trefkans met traditionele methoden veel sneller af dan die met Environmental DNA.

en niet aan andere soorten, is cruciaal, omdat DNA van andere soorten anders voor valse positieven kan zorgen.

Voor het ontwikkelen van de primers is DNA verzameld van acht verschillende populaties grote modderkruipers binnen Nederland. Door dit DNA met elkaar te vergelijken, is gezocht naar een stukje DNA dat binnen alle populaties gelijk is. Vervolgens is hierbinnen gezocht naar een sequentie die uniek is voor de grote modderkruiper. Dit is gedaan door het DNA van de grote modderkruiper te vergelijken met DNA van 44 andere Nederlandse vissoorten uit onze eigen databank (verzameld voor dit project) en met reeds bekende DNA-codes die zijn opgeslagen in Genbank, een databank met daarin van alle soorten de DNA-codes die reeds bekend zijn.

De gevonden primers zijn vervolgens succesvol getest op weefsel van de grote modderkruiper en weefsel van 44 andere Nederlandse vissoorten.

### Monstername

In oktober 2011 zijn in twaalf wateren water-

monsters genomen. Hierbij zijn vier wateren met hoge dichtheden en vier wateren met lage dichtheden grote modderkruipers geselecteerd. Daarnaast zijn ook vier controlewaters meegenomen waar de grote modderkruiper niet voorkomt. Deze wateren zijn van belang om aan te tonen dat de primers specifiek genoeg zijn en niet toevallig DNA van andere soorten vermeerderen tijdens de PCR en daardoor valse positieven geven. De watermonsters zijn verzameld op basis van een nieuw gestandaardiseerd protocol, dat ontwikkeld is door Spygen. Hierbij is zeer nauwkeurig gewerkt met voor elke monsterlocatie telkens nieuw gesteriliseerd materiaal om besmetting van monsters met DNA van andere locaties te voorkomen. Bij het verzamelen van de monsters is ook gebruik gemaakt van de aanwezige kennis over het habitatgebruik van grote modderkruipers om zo op de meest kansrijke plaatsen watermonsters te verzamelen.

### Analyses

De monsters zijn geanalyseerd in een speciaal voor eDNA ingericht laboratorium. Doordat gewerkt wordt met zeer lage

dichtheden aan DNA (soms kan het een enkele streng in een monster zijn) is het van groot belang onder optimale condities te werken. Aan de ene kant om besmetting van monsters te voorkomen, aan de andere kant om de extracties van DNA uit de monsters te optimaliseren. Indien dit namelijk onnauwkeurig gebeurt, kan een lage hoeveelheid DNA in de monsters gemist worden, waardoor ten onrechte wordt aangenomen dat de doelsoort niet aanwezig was (valse nul-waarneming). Bij het opwerken van het eDNA zijn afzonderlijk van elkaar zowel het vrij in het water opgeloste DNA als het aan het organisch materiaal gebonden DNA geëxtraheerd. Per monster en per extractie (vrij opgelost/organisch gebonden DNA) zijn acht afzonderlijke PCR-reacties gedraaid. Ook is een positieve controle met daarin eerder verzameld DNA van de grote modderkruiper en een aantal negatieve controles zonder DNA meegenomen.

De controles laten zien dat geen besmetting van de monsters optreedt tijdens de analyse (negatieve controles) en dat de analyse en primers goed werken (positieve analyse).

Resultaten van de Environmental DNA-analyses. In de eerste kolom staat het monsternummer, gevolgd door de locatie en dichtheid van grote modderkruipers. De kolommen eDNA water en eDNA organisch geven het aantal positieve PCR-reacties (eDNA grote modderkruiper aangetroffen) van respectievelijk de analyse van het water en het organisch materiaal. De laatste kolom geeft aan of de grote modderkruiper is aangetoond.

	locatie	dichtheid grote modderkruiper	eDNA water	eDNA organisch	grote modderkruiper aangetoond
1	Rijnstrangen - A	laag	4/8	2/8	ja
2	Rijnstrangen - B	hoog	7/8	7/8	ja
3	Wageningen	hoog	1/8	0/8	ja
4	golfbaan de Batouwe	hoog	1/8	0/8	ja
5	Rijswijkse Veld	hoog	0/8	2/8	ja
6	Lelystad	afwezig	0/8	0/8	nee
7	Zaandam	afwezig	0/8	-	nee
8	Molenbeek Zutphen	laag	1/8	5/8	ja
9	Kromme Beek	laag	1/8	1/8	ja
10	Zuidlaardermeer	laag	0/8	0/8	nee
11	Loppersum	afwezig	0/8	-	nee
12	Tuinvijver Nijmegen	afwezig	0/8	-	nee



Rijnstrangen, een locatie met een lage dichtheid grote modderkruipers (foto's: Jelger Herder).



Wageningen, een locatie met een hoge dichtheid grote modderkruipers, een typische habitat waar de soort lastig te bemonsteren is met traditionele methoden.

## Resultaten

De resultaten van de analyse van de twaalf monsters staan in de tabel. De vier controlelocaties waar de grote modderkruiper afwezig was, scoorden zoals verwacht negatief in de analyse. Dit geeft aan dat de primers soortspecifiek zijn voor de grote modderkruiper en niet onbedoeld het DNA van andere soorten vermeerderen. Los van elkaar is gekeken naar de aanwezigheid van in het water opgelost DNA en DNA gebonden aan het organisch materiaal (bodemdeeltjes). Bij de analyse van het vrij in het water opgeloste DNA werd de aanwezigheid van grote modderkruiper op zes van de acht locaties aangetoond. Bij de analyse van het aan het organisch materiaal gebonden DNA werd de grote modderkruiper eveneens op zes van de acht locaties aangetoond.

Met de combinatie van beide analyses is de grote modderkruiper aangetoond in zeven van de acht wateren. Wateren met een hoge dichtheid aan grote modderkruiper gaven een 100 procent detectie (vier van de vier) en wateren met een lage dichtheid grote modderkruiper gaven een 75 procent detectie. Gemiddeld komt dit neer op een detectiescore van 87,5 procent op basis van een eenmalig bezoek waarbij een watermonster verzameld is.

## Discussie

De enige locatie waar het niet gelukt is de grote modderkruiper met behulp van eDNA aan te tonen, betreft het Zuidlaardermeer. Hier zijn in het voorjaar van 2011 met zeer grote inspanning (twee dagen elektrovisseren, een dag schepnetvissen, een fuiken ronde en het meelopen met schoningswerkzaamheden) slechts enkele individuen aangehouden. Enige tijd voor de eDNA-bemonstering is er geschoond op deze locatie, waardoor de grote modderkruipers mogelijk zijn gevlucht naar andere sloten. De hoeveelheid aangetroffen eDNA in de monsters was lager dan verwacht in verge-

lijking met eerder uitgevoerde studies. Dit is waarschijnlijk te verklaren door de periode waarin de watermonsters genomen zijn. In oktober zijn de grote modderkruipers minder actief dan tijdens het groeiseizoen en de voortplantingsperiode (met name april en mei)<sup>2)</sup>. Als de dieren inactiever zijn, produceren ze minder eDNA (feces, urine en huidcellen). In stilstaand water verplaatst dit DNA zich ook nog eens minder door de waterkolom. Desondanks is de aanwezigheid van de grote modderkruiper op zeven van de acht locaties met het in oktober verzamelde eDNA aangetoond. Ook op locaties met lage dichtheden van de soort blijkt Environmental DNA goed te werken. Zo werd op de locatie Rijnstrangen - A in het verleden slechts één juveniel dier aangehouden. Gezien de zeer hoge detectiekans (87,5 procent) en de kleine inspanning per locatie (20 tot 30 minuten) is de Environmental DNA-methode veel efficiënter en betrouwbaarder dan traditionele methoden zoals schepnet, elektrovisseren of fuiken.

## Blik op de toekomst

De Environmental DNA-methode is een doorbraak binnen het veldonderzoek naar het voorkomen van (lastig te detecteren) watergebonden soorten. De methode kan tot forse kostenbesparingen leiden, wat zeer welkom is nu monitoringsbudgetten onder druk komen te staan. Op het moment van schrijven zijn succesvol primers ontwikkeld voor onder andere grote modderkruiper, kamsalamander, knoflookpad, Amerikaanse brulkikker, gevlekte witsnuitlibel, otter en de humus-kieuwpootkreeft. RAVON is samen met Spyggen bezig met het ontwikkelen van soortspecifieke primers voor meer soorten. Daarnaast richt het onderzoek zich op nieuwe toepassingen van Environmental DNA en het verbeteren van de monstereethodes.

Voor de nabije toekomst werkt RAVON ook aan een tweede toepassing van

eDNA, waarbij gebruik wordt gemaakt van universele primers<sup>3)</sup>. Deze richten zich niet op een doelsoort maar vermenigvuldigen al het eDNA in een watermonster. Vervolgens worden de DNA-codes van alle losse stukjes DNA uitgelezen met behulp van een DNA-sequencer. De gevonden DNA-codes worden daarna door een computer vergeleken met een databank van bekende DNA-codes. Op deze manier kan een soortenlijst worden gegenereerd. Het genereren van complete soortenlijsten voor vissen en amfibieën uit eDNA-monsters is reeds succesvol getest. Het onderzoek richt zich nu op het kwantificeren van de hoeveelheid DNA per soort in de monsters in relatie tot de werkelijke dichtheid van de soorten in een water. De verwachting is dat het in de nabije toekomst mogelijk wordt om met deze methode naast de soortensamenstelling ook dichtheden per soort te bepalen. Hieruit kan vervolgens de KRW-score voor vis in een waterlichaam berekend worden.

## LITERATUUR

- 1) De Bruin A. en J. Kranenbarg (2009). Fossiel uit een dynamisch deltagebied. Verspreiding en achteruitgang van de grote modderkruiper in een historisch perspectief & aanbevelingen tot behoud van deze soort. Stichting RAVON.
- 2) Spikmans F., T. de Jong, F. Ottburg en J. Kranenbarg (2008). Methodiek en richtlijnen voor verspreidingsonderzoek naar bittervoorn, kleine modderkruiper en grote modderkruiper. Stichting RAVON.
- 3) Ficetola G., C. Miaud, F. Pompanon en P. Taberlet (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. Biol Letters nr. 4, pag. 423-425.
- 4) Dejean T., A. Valentini, A. Duparc, S. Pellier-Cuit, F. Pompanon, P. Taberlet en C. Miaud (2011). Persistence of Environmental DNA in freshwater ecosystems. PLoS one 8, e23398.
- 5) Herder J. (2011). Pilot Environmental DNA grote modderkruiper. Stichting RAVON. Rapport 2011-102.
- 6) www.environmental-dna.nl.