

DE TOEPASSING VAN eDNA IN DE MONITORING VAN WATERORGANISMEN



RAPPORT

2013
24

DE TOEPASSING VAN EDNA IN DE MONITORING VAN WATERORGANISMEN
HOE VER ZIJN WE EN WAT MOETEN WE NOG WETEN?

RAPPORT

2013

24

ISBN 978.90.5773.612.4



COLOFON

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

AUTEURS

R. Bijkerk, W. Patberg, J.H. Wanink (Koeman en Bijkerk bv), E. Wallaart, J. Warmink
(Sylphium Life Sciences)

Met bijdragen van: J.M. Baveco (Alterra), B. van der Hoorn (Naturalis Biodiversity Center),
B. Wullings (KWR Watercycle Research Institute), E.H.R.R. Lammens (RWS Water, Verkeer en
Leefomgeving), P. Breyne (Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek), S. Verbeek (Waterschap
Noorderzijlvest), T. van der Wijngaart en B. van der Wal (STOWA)

TREFWOORDEN eDNA, DNA, ecologische monitoring, KRW, visstandbemonstering, determinatie, waterkwaliteit,
waterkwaliteitsbeheer, ecologie

REFERAAT Dit rapport geeft technische informatie over de toepassing van environmental DNA en over wat
nodig is om te komen tot een volwaardige inventarisatiemethode voor met name vissen. Hierbij
wordt ingegaan op de mogelijkheden voor het waterbeheer.

CITATIE RAPPORT

Bijkerk, R., W. Patberg, J.H. Wanink, E. Wallaart & J. Warmink. 2013.
De toepassing van eDNA in de monitoring van waterorganismen:
hoe ver zijn we en wat moeten we nog weten? STOWA rapport 2013-24

FOTO VOORKANT

Elk dier laat DNA in het milieu achter dat karakteristiek is voor de soort

DRUK Kruyt Grafisch Adviesbureau
STOWA STOWA 2013-24
ISBN 978.90.5773.612.4

COPYRIGHT De informatie uit dit rapport mag worden overgenomen, mits met bronvermelding. De in het rapport
ontwikkelde, dan wel verzamelde kennis is om niet verkrijgbaar. De eventuele kosten die STOWA voor
publicaties in rekening brengt, zijn uitsluitend kosten voor het vormgeven, vermenigvuldigen en
verzenden.

DISCLAIMER Dit rapport is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten
bij toepassing ervan de resultaten te allen tijde kritisch worden beschouwd. De auteurs en STOWA
kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het
gedachtengoed uit dit rapport.

TEN GELEIDE

Monitoringsgegevens over de chemische samenstelling van het water en de aanwezige planten en dieren geven een oordeel over de waterkwaliteit en ecologie van het water. Voor de Kaderrichtlijn Water wordt een viertal biologische elementen gemonitord, waaronder vissen. Om te kunnen vaststellen welke vissoorten en in welke aantallen ze aanwezig zijn, worden visstandbemonsteringen uitgevoerd. Bij een dergelijke bemonstering worden de vissen gevangen en bekeken.

DNA, de bouwsteen van elk levend organisme, levert een unieke vingerafdruk per soort en biedt daardoor een interessante kans voor monitoring. De toepassing van technieken gebaseerd op de herkenning van DNA heeft de laatste jaren een grote vlucht genomen. Er zijn bijvoorbeeld veelbelovende resultaten geboekt bij de detectie van moeilijk waar te nemen soorten vissen en bij de monitoring van algen met de Hydrochip. Beide toepassingen maken gebruik van de soortspecifieke kenmerken van DNA.

Voor de inventarisatie van moeilijk te vangen soorten wordt gebruik gemaakt van eDNA (environmental DNA); stukjes erfelijk materiaal die de dieren achterlaten in het milieu tijdens hun normale activiteiten. Vooral voor de monitoring van vissen is dit erg interessant, zeker voor waterschappen: de dieren hoeven op deze manier niet fysiek te worden gevangen. Dit levert minder verstoring op voor de vissen en hun milieu en kan waarschijnlijk ook de kosten voor monitoring terugdringen. Er leven nog wel vragen rondom de toepassing van eDNA voor het waterbeheer: Kan de methode betrouwbare gegevens opleveren tegen geringere kosten? En kunnen de resultaten een rol spelen in de ecologische beoordelingen voor de Kaderrichtlijn Water?

Om antwoord te kunnen geven op onder andere deze vragen heeft de STOWA voorliggend rapport laten opstellen. Het geeft technische informatie over de toepassing van eDNA, over wat nodig is om te komen tot een volwaardige inventarisatiemethode en inzicht in de mogelijkheden voor het waterbeheer.

In het rapport zijn concrete onderzoeksvragen en onderzoeksmogelijkheden geformuleerd die belangrijk zijn voor het ontwikkelen van een betrouwbare bemonsteringsstrategie. Een belangrijk onderdeel van het gewenste onderzoek is het krijgen van inzicht in de verspreiding en afbraak van eDNA in het water.

Joost Buntsma,
directeur STOWA

SAMENVATTING

WAT IS eDNA?

Environmental DNA (eDNA) is erfelijk materiaal dat dieren bij hun dagelijkse activiteiten achterlaten in het milieu. Met behulp van eDNA kunnen we vaststellen welke soorten in het water aanwezig zijn geweest, in een voorafgaande periode van circa een week.

TOEPASSING IN HET WATERBEHEER, VOOR- EN NADELEN

De toepassing van eDNA voor het detecteren van soorten heeft sinds 2008 een grote vlucht genomen. In Nederland zijn veelbelovende resultaten geboekt met het vaststellen van de aanwezigheid van de Grote modderkruiper, de Kwabaal en de Rivierprik. De vraag is welke perspectieven eDNA biedt voor de biologische monitoring in het waterbeheer.

De toepassing van eDNA heeft de volgende voordelen:

- de eDNA-methode is non-destructief en roept dus geen ethische of ecologische bezwaren op; dit betreft zowel de dieren zelf als het habitat waarin zij leven;
- de eDNA-methode is gevoeliger dan gangbare methoden, met name voor soorten die moeilijk te inventariseren zijn en/of in lage dichtheid voorkomen;
- de eDNA-methode levert, indien goed gevalideerd, altijd een foutloze determinatie van soorten op, zonder dat determinatiekennis en -vaardigheid zijn vereist.

Voor de waterbeheerder heeft de toepassing van eDNA (nog) de volgende nadelen:

- de methode levert nog geen kwantitatieve schatting op in termen van aantal of biomassa per volume- of oppervlakte-eenheid; dat verkleint de toepasbaarheid voor de *huidige* maten voor de Kaderrichtlijn Water (KRW);
- de methode levert geen inzicht op in morfologische eigenschappen van de organismen, zoals lengte, ontwikkelingsstadium, fecunditeit, vitaliteit;
- de methode is nog niet voldoende ontwikkeld, in die zin dat nog niet bekend is hoe een bemonstering moet worden opgezet om een bepaalde detectiekans van soorten te kunnen realiseren. Met andere woorden: de betrouwbaarheid van de methode is nog onvoldoende bekend.

PERSPECTIEVEN VOOR HET WATERBEHEER

Het gebrek aan inzicht in een betrouwbare bemonsteringsstrategie en het gemis aan kwantitatieve gegevens, maken de mogelijkheden van de eDNA methode voor de waterbeheerder op dit moment beperkt. Voor de nabije toekomst is de vraag enerzijds, of we op termijn wel de gewenste kwantitatieve gegevens zouden kunnen krijgen, en anderzijds, of kwantitatieve gegevens wel altijd noodzakelijk zijn voor een indruk van de ecologische toestand, ook in een beoordeling voor de KRW. Met de kwantitatieve PCR-methode (qPCR) kan men een indruk krijgen van de hoeveelheid DNA. Op basis hiervan zou men het aantal individuen per soort in abundantieklassen kunnen uitdrukken. In een validatiestudie zou men dan vervolgens een vergelijking kunnen maken met de kwantitatieve resultaten van de thans gangbare monitoringsmethode.

De methode biedt al wel perspectieven voor de waterbeheerder die op basis van de verspreiding van bepaalde diadrome vissoorten inzicht wil krijgen in de connectiviteit en de habitatgeschiktheid binnen zijn watersysteem. Ook hiervoor geldt echter dat de betrouwbaarheid van de methode voor betreffende soorten nog moet worden vastgesteld, in samenhang met bemonsteringsstrategieën.

KOSTEN

Een veel genoemd voordeel, de methode zou goedkoper zijn, moet voor het waterbeheer genuanceerd worden, zolang er nog geen inzicht is in de relatie tussen betrouwbaarheid en onderzoeksinspanning (aantal bemonsteringen, aantal monsters).

De analysekosten per monster voor eDNA liggen naar verwachting tussen de 45 en omstreeks 350 Euro, afhankelijk van het aantal soorten dat gedetecteerd moet worden (één tot meerdere tientallen), met gebruikmaking van de klassieke PCR-techniek met gevalideerde primers in combinatie met gel-elektroforese en exclusief omzetbelasting. In deze prijsopgave zijn de ontwikkelkosten niet verdisconteerd, evenmin de kosten van bemonstering.

De analyseprijs bij toepassing van een nieuwe techniek als High Throughput Sequencing (next generation sequencing), bedraagt momenteel 2 400 à 3 000 Euro per monster. Hierbij kan al het DNA dat in het monster aanwezig is gedetermineerd worden, mits de sequenties bekend zijn. De prijs zal naar verwachting dalen in de komende jaren.

NAAR EEN VOLWAARDIGE METHODE

Een volwaardige op eDNA gebaseerde inventarisatiemethode moet aan de volgende voorwaarden voldoen:

- het is bekend welke stappen en externe factoren een cruciale invloed hebben op de betrouwbaarheid van de meting;
- het is bekend hoe de betrouwbaarheid van de meting vergroot kan worden;
- de methode is geoptimaliseerd voor een goede prijs/kwaliteit-verhouding;
- er is een werkvoorschrift of protocol dat de uitvoering standaardiseert.

Cruciaal voor de vervolmaking van de methode en de toepasbaarheid in het waterbeheer, is onderzoek naar de verspreiding van eDNA in het milieu (bepaald door onder andere de flux en de stabiliteit van DNA in het water) om een optimale bemonsteringsstrategie te kunnen ontwikkelen.

Dit onderzoek bestaat idealiter uit een combinatie van modelonderzoek (de inzet van simulatiemodellen) en experimenteel onderzoek in het laboratorium en het veld (om modelparameters beter te schatten en de modeluitkomsten te toetsen).

NAAR EEN METHODE VOOR KWANTIFICERING

Door het inzetten van qPCR kan het signaal proportioneel worden gemaakt aan de hoeveelheid eDNA van een soort in het monster. Een zekere kwantificering is dus mogelijk. Onderzoek moet uitwijzen of een betrouwbare omrekening naar een vertrouwde grootheid, biomassa per hectare, mogelijk is en zo nee, of alternatieve grootheden bruikbaar zijn in een ecologische kwaliteitsbeoordeling.

DE STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. Dat zijn alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen en de provincies.

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van inventarisaties van de behoefte bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstituten en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, zonodig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n 6,5 miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: 033 - 460 32 00.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 2180, 3800 CD Amersfoort.

Email: stowa@stowa.nl.

Website: www.stowa.nl

DE TOEPASSING VAN EDNA IN DE MONITORING VAN WATERORGANISMEN

INHOUD

	TEN GELEIDE	
	SAMENVATTING	
	STOWA IN HET KORT	
1	INLEIDING	1
1.1	Aanleiding	1
1.2	Doel	1
1.3	Afbakening	1
1.4	Leeswijzer	2
2	WAT IS EDNA?	3
2.1	Environmental DNA	3
2.2	Karakteristiek maar kortlevend	3
3	TOEPASSING VAN EDNA	4
3.1	Principe	4
3.2	Detectiekans	4
3.3	Voor- en nadelen	5
3.4	Door wie	6
	3.4.1 Onderzoekers in Nederland	6
	3.4.2 Onderzoekers in Europa	8
	3.4.3 Onderzoekers in Amerika en Azië	9
3.5	Welke soorten?	10
3.6	Kosten	11

4	DE EDNA-METHODE IN DETAIL	13
4.1	Bemonsteringstrategie	13
4.2	Monsterbehandeling	14
4.3	Analyse	14
	4.3.1 Het extraheren van eDNA	15
	4.3.2 Het vermeerderen en herkennen van doelsoort DNA	15
4.4	Controles	16
4.5	Detectiekans	17
4.6	Stand van zaken	18
5	WAT KUNNEN WE VERWACHTEN EN WAT NIET	21
5.1	De voordelen	21
5.2	De nadelen	24
5.3	De mogelijkheden van eDNA	25
5.4	De onmogelijkheden van eDNA	27
6	WAT IS NODIG VOOR EEN VOLWAARDIGE METHODE?	29
6.1	Voorwaarden	29
6.2	Onderzoek naar betrouwbaarheid	29
6.3	Onderzoek naar kwantificering	30
6.4	Modelonderzoek	30
6.5	Experimenteel veldonderzoek	32
6.6	Optimalisatie van prijs/kwaliteit-verhouding	32
6.7	Standaardisatie van bemonstering en analyse	33
6.8	Validatie van primers	33
6.9	Begroting nader onderzoek	34
6.10	Een overzicht van mogelijke partners in het onderzoek	36
6.11	Een overzicht van mogelijke subsidieverleners	36
7	LITERATUUR	38
	WEBSITES	41

1

INLEIDING

1.1 AANLEIDING

In Nederland werken meerdere partijen aan methoden om de aanwezigheid van soorten in het milieu vast te stellen op basis van eDNA. Zoals wel vaker bij innovatieve ontwikkelingen, wekken de eerste berichten grote verwachtingen, ook bij ecologen die werkzaam zijn in het water- of natuurbeheer. Klassieke biologische inventarisaties immers, vergen specialistische kennis en kosten veel tijd en geld. Bovendien leiden zij niet altijd tot resultaten die voldoende betrouwbaar zijn. Met eDNA zou een meer objectieve en betrouwbare analyse beschikbaar zijn, die bovendien sneller en goedkoper zou kunnen zijn voor de beheerder. Maar zijn deze verwachtingen terecht?

Dat men door het meten van eDNA informatie kan krijgen over het voorkomen van soorten en daarmee kan bijdragen aan een betere bescherming en een gericht beheer, staat buiten kijf. Maar weten we al voldoende om deze informatie goed te kunnen interpreteren? En kan eDNA ook een rol gaan spelen in de meetprogramma's oppervlaktewaterkwaliteit van onze waterbeheerders? Deze vragen staan centraal in dit document, dat is samengesteld op verzoek van de STOWA.

1.2 DOEL

In dit rapport geven we een actueel overzicht van de stand van zaken met betrekking tot de toepassing van eDNA en de technologische ontwikkeling die we op middellange termijn kunnen verwachten. Daarnaast willen we in detail beschrijven welke onderzoeksvragen beantwoord moeten worden en wat dit kost aan tijd en geld, om eDNA op een gestandaardiseerde en betrouwbare manier in te kunnen zetten voor de monitoring van organismen ten dienste van het beheer van oppervlaktewater en natuur.

In concreto dient dit rapport vier doelen:

- 1) Een goed begrip bij de waterbeheerder en andere geïnteresseerde ecologen en beleidsmakers, inzake het principe en de mogelijkheden en onmogelijkheden van de toepassing van eDNA.
- 2) Een overzicht van eisen die gesteld moeten worden aan een volwaardige methode voor de monitoring van dierlijke organismen op basis van eDNA.
- 3) Inzicht in de aard, omvang en kosten van het onderzoek dat uitgevoerd moet worden om van de eDNA methode een volwaardige, betrouwbare methode te maken.
- 4) Een overzicht van toepassingsmogelijkheden van de eDNA methode binnen het waterbeheer en de voor- en nadelen ten opzichte van klassieke methoden.

1.3 AFBAKENING

In dit rapport richten we ons vooral op gewervelde dieren in het oppervlaktewater, zoals amfibieën, vissen en zoogdieren. De reden is dat deze groepen, met name vissen, veel aandacht krijgen in de eerste toepassingen. Zijn onze opmerkingen over detectiekans en kwantificering

in dit rapport ook van toepassing op andere organismengroepen? Dat hangt van de aard van de inventarisatiemethode af: wel als de detectie en identificatie gebaseerd is op eDNA in een monster uit de omgeving van het dier, niet als de identificatie gebaseerd is op het DNA in een monster waarin de dieren zelf zijn verzameld.

1.4 LEESWIJZER

In de hoofdstukken 2 en 3 beschrijven we beknopt wat eDNA is, hoe het wordt toegepast en door wie, welke voor- en nadelen er (nu nog) aan verbonden zijn en wat de kosten zijn. In hoofdstuk 4 gaan we dieper op de methodische kanten van de toepassing in en in hoofdstuk 5 op de huidige voor- en nadelen. Inhoudelijk kennen deze hoofdstukken dus enige overlap met de hoofdstukken 2 en 3. In hoofdstuk 6 ten slotte, wordt aangegeven wat naar ons idee nodig is om een volwaardige methode te maken en geven we een voorzet voor nader onderzoek hiertoe.

2

WAT IS EDNA?

2.1 ENVIRONMENTAL DNA

De 'e' in eDNA staat voor environmental en DNA voor Desoxyribose Nucleic Acid (Desoxyribonucleïnezuur). Environmental DNA is DNA dat los van het oorspronkelijke organisme in het milieu aanwezig is.

DNA is de belangrijkste chemische drager van erfelijke informatie. Het is aanwezig in alle organismen, in alle cellen en lichaamseigen vloeistoffen, weefsels en structuren. Via de ontlasting, het afgeven van slijm, of het loslaten van cellen, haren of schubben, raken dieren DNA kwijt in het milieu en ontstaat eDNA.

2.2 KARAKTERISTIEK MAAR KORTLEVENDE

Ook het eDNA is kenmerkend voor een soort. Daardoor kan men het gebruiken om de aanwezigheid van soorten in het milieu aan te tonen. De levensduur van eDNA in het milieu is echter beperkt. De verbinding wordt gemakkelijk afgebroken door bacteriën. Hoe snel dat gaat is afhankelijk van onder andere de omgevingstemperatuur. Opgesloten in haren of schubben kan eDNA langer aantoonbaar blijven en ook de levensduur van korte DNA-fragmenten is relatief lang. Met de huidige kennis moet men er vanuit gaan dat eDNA binnen een week na uitscheiding weer verdwenen kan zijn (Thomsen *et al.* 2012b). Verder wetenschappelijk onderzoek zal hier meer inzicht in moeten verschaffen.

De snelle afbraak van eDNA lijkt een nadeel voor de toepasbaarheid. Immers, hierdoor krijgt de stof maar weinig tijd om zich te verspreiden over het milieu. Dit verkleint de detectiekans van het organisme, vooral als het dier honkvast is. Een voordeel van het kortlevend karakter van eDNA is, dat hierdoor alleen organismen gedetecteerd worden die kortgeleden ook werkelijk aanwezig waren. Met de eDNA-methode zullen we in watermonsters geen (sub)fossielen vinden. Onder andere omstandigheden is een vergelijkbare methode wel ingezet in paleo-ecologisch onderzoek (zie intermezzo 2.1).

INTERMEZZO 2.1

De term eDNA is niet nieuw en afkomstig uit de microbiële ecologie (Ogram *et al.* 1987). Hier is de eDNA-methode ingezet voor de detectie van micro-organismen in verschillende, aquatische en terrestrische milieus (Venter *et al.* 2004; Warmink & van Elsas 2008). Soortgelijke technieken zijn ook toegepast in archeologisch onderzoek, om planten en dieren uit het verleden te kunnen aantonen op basis van hun DNA (Willerslev *et al.* 2003; Lydolph *et al.* 2005; Haile *et al.* 2007; Hofreiter *et al.* 2003).

3

TOEPASSING VAN EDNA

3.1 PRINCIPE

Om met eDNA de aanwezigheid van een soort in een water aan te kunnen tonen, moet men een watermonster nemen. In het laboratorium wordt dit monster gefiltreerd en wordt eDNA uit het filtraat geëxtraheerd. Aan dit eDNA worden soortspecifieke primers toegevoegd. Een primer is een stukje DNA dat overeenkomt met een stukje DNA van de soort die men wil aantonen (de doelsoort). Wanneer het monster eDNA van de doelsoort bevat, gaat deze primer het startpunt vormen van de polymerase-kettingreactie, in het Engels de Polymerase Chain Reaction, afgekort PCR. Door deze reactie wordt dit stukje DNA van de doelsoort vermenigvuldigd.

Het resultaat van de PCR is dus een grote hoeveelheid DNA, kenmerkend voor de doelsoort. Dit DNA kan zichtbaar gemaakt worden op een gel. Omdat elke doelsoort zijn eigen karakteristieke plek op de gel heeft, kan in één oogopslag afgelezen worden om welke soort het gaat. Naast deze klassieke PCR aanpak is “realtime PCR”, ook wel bekend als “quantitative PCR” of “qPCR”, een nieuwe standaard methode van PCR. In plaats van dat het DNA zichtbaar wordt gemaakt op een gel wordt het DNA realtime gedurende het PCR proces zichtbaar gemaakt door de inbouw van fluorofore labels in het DNA.

Twee aspecten zijn cruciaal om vals positieve resultaten te vermijden:

- Contaminatie moet voorkomen worden: monsterflesjes, filteropstelling en andere hulpmiddelen die in contact komen met het monster, moeten geen DNA van de doelsoort(en) bevatten. De bemonstering zelf moet zodanig uitgevoerd worden dat alleen eDNA verzameld wordt dat afkomstig is uit het beoogde compartiment op het beoogde meetpunt.
- De primer moet dusdanig soortspecifiek zijn dat geen binding aan DNA van andere soorten dan de doelsoort mogelijk is.

Naast de inmiddels klassieke methode die gebruik maakt van primers is er een nieuwe ontwikkeling, waarbij al het DNA in een monster vermenigvuldigd wordt en vervolgens gede-termineerd aan de hand van een ‘bibliotheek’ van bekende sequenties (zie hoofdstuk 4 High throughput sequencing).

3.2 DETECTIEKANS

Eén stukje DNA van de doelsoort in het watermonster is al voldoende om de soort met deze methode aan te tonen. De kans om een organisme aan te tonen, de detectiekans, is daarmee gelijk aan de kans om een stukje DNA in het watermonster te krijgen. De detectiekans wordt dus bepaald door de opzet van de bemonstering: waar verzamelen we de monsters en hoeveel monster nemen we...?

INTERMEZZO 3.1

De toepassing van DNA in de identificatie van individuen is al ruim twintig jaar bekend uit forensisch onderzoek (NFI 2006). Om soorten betrouwbaar te herkennen wordt DNA al enkele jaren toegepast. Dit wordt 'DNA barcoding' genoemd (Valentini *et al.* 2010). Hierbij gaat het dus om DNA in organismen en niet om uitgescheiden eDNA in het milieu. De barcoding technologie vergelijkt DNA sequenties van de te bepalen soort met DNA sequenties in een publieke database, zoals Genbank, ENA, DDBJ, of het CBOL. Dit geeft in veel gevallen een meer betrouwbare identificatie dan op basis van morfologische kenmerken mogelijk zal zijn (Valentini *et al.* 2010). Om DNA barcoding te kunnen toepassen moet het organisme echter wel gevangen worden, zodat men DNA kan isoleren uit weefsel. Deze methode kan dan ook als invasief en in veel gevallen zelfs als destructief gezien worden. Ook met de HydroChip, ontwikkeld voor de determinatie van kiezelwieren, wordt de identificatie gebaseerd op het DNA in de bemonsterde organismen.

3.3 VOOR- EN NADELEN

De belangrijkste voordelen van de eDNA methode zijn:

- Hij roept geen ethische bezwaren op omdat soorten niet gevangen hoeven te worden en het habitat niet verstoord wordt (de methode is non-destructief).
- Hij is gevoelig en daardoor geschikt voor lastig te vangen soorten of soorten die in lage dichtheid voorkomen.
- Hij onderscheidt soorten op moleculaire gronden, waardoor soorten die moeilijk op habitus of geluid te identificeren zijn toch met zekerheid vastgesteld kunnen worden.

De belangrijkste nadelen van de eDNA methode zijn op dit moment:

- Hij kan (nog) geen betrouwbare kwantitatieve informatie opleveren over het voorkomen van soorten in termen van aantal of biomassa per hectare.
- Hij kan geen informatie verschaffen over de lengte, het ontwikkelingsstadium, de fecunditeit of de vitaliteit van de doelsoort.
- Hij heeft nog geen bekende betrouwbaarheid; omtrent de verspreiding van eDNA is nog te weinig bekend om een optimale bemonsteringsstrategie te kunnen ontwikkelen.

FIGUUR 1

OM DE AANWEZIGHEID VAN EEN ZELDZAME EN LASTIG TE VANGEN SOORT ZOALS DE KWABAAL (*LOTA LOTA*) AAN TE TONEN, IS DE EDNA METHODE ZEER GESCHIKT



In hoofdstuk 5 beschrijven we de voor- en nadelen in meer detail en geven we aan welke toepassingen we in de komende jaren wel en niet kunnen verwachten. In hoofdstuk 6 geven we de criteria waaraan een volwaardige eDNA-methode zou moeten voldoen en presenteren we een opzet voor nader onderzoek om de methode voor monitoringdoeleinden te vervolmaken.

3.4 DOOR WIE

In binnen- en buitenland zijn meerdere organisaties bezig met de ontwikkeling en toepassing van eDNA-methoden. Hieronder zijn universiteiten en andere onderzoeksinstituten, maar ook adviesbureaus en natuurbeschermingsorganisaties.

In deze paragraaf geven we een overzicht van de actieve partijen, welk doel ze nastreven en welke vorderingen ze hebben gemaakt. Hierbij richten we ons op aquatische organismen en maken we onderscheid tussen Nederland en andere landen. Ons overzicht is grotendeels gebaseerd op publicaties en naar alle waarschijnlijkheid niet compleet. Daarbij komt dat nieuwe partijen zich met enige regelmaat melden.

Overigens, de methoden die de verschillende partijen toepassen worden niet altijd gepubliceerd. Hierdoor kunnen ze onderling niet met elkaar worden vergeleken en kan niet worden gecontroleerd wat de betrouwbaarheid van de methode is met betrekking tot specificiteit en gevoeligheid.

3.4.1 ONDERZOEKERS IN NEDERLAND

RAVON (REPTIELEN AMFIBIEËN VISSSEN ONDERZOEK NEDERLAND)

RAVON is in Nederland een pionier op het gebied van de toepassing van eDNA. In 2011 voerde RAVON een succesvolle pilot uit, waarbij de eDNA methode werd ingezet voor het aantonen van de Grote modderkruiper op een aantal locaties in Nederland (Herder 2011).

Voor de ontwikkeling van methoden heeft RAVON een exclusieve samenwerkingsovereenkomst met het bedrijf Spygen uit Frankrijk (zie paragraaf 3.4.2). Binnen deze samenwerking brengt Spygen haar expertise in op het gebied van het werken met kleine hoeveelheden DNA, van monstermethodiek en genetika, en RAVON haar kennis over de ecologie en verspreiding van soorten. Daarnaast heeft RAVON een grote achterban waardoor het mogelijk is grootschalige projecten en onderzoeken op te zetten. In 2012 hebben de Zoogdiervereniging (VZZ) en de Vlinderstichting zich bij dit consortium aangesloten.

Samen met Spygen is RAVON bezig met de ontwikkeling van methoden om meerdere soorten tegelijk te detecteren. Daarnaast richten ze zich op nieuwe toepassingen van eDNA en het verbeteren van de monstermethodes (Herder *et al.* 2012) Op de website www.environmental-dna.nl en via publicaties maken zij hun werkzaamheden en vorderingen op het gebied van eDNA kenbaar.

KOEMAN EN BIJKERK BV / SYLPHIUM LIFE SCIENCES

Het ecologisch onderzoeksbureau Koeman en Bijkerk bv en het biotechnologiebedrijf Sylphium Life Sciences zijn in 2012 begonnen met de ontwikkeling van primers voor de vissoorten Kwabaal, Rivierprik, Steur en Blankvoorn, voor de Kamsalamander en voor de veroorzaker van zwemmersjeuk (*Trichobilharzia ocellata*). Sylphium heeft haar laboratorium speciaal ingericht voor de analyse van eDNA in watermonsters. Voor Kwabaal en Rivierprik zijn inmiddels goede resultaten behaald.

Ook in deze samenwerking wordt expertise op het gebied van DNA en PCR-technieken gecombineerd met kennis van de ecologie van soorten en van ecologische monitoring en beoordeling in het waterbeheer.

Naast de ontwikkeling van de analysemethode houdt deze combinatie zich ook bezig met de optimalisatie van de bemonstering en de validatie van de eDNA-methode in het algemeen.

FIGUUR 2

DE RIVIERPRIK (*LAMPETRA FLUVIATILIS*), MET SUCCES AANGETOOND DOOR MIDDEL VAN EDNA



NATURALIS BIODIVERSITY CENTER

Het nationale biodiversiteitscentrum Naturalis is al enkele jaren bezig met onderzoek naar de toepassing van DNA in de vorm van barcoding. Een voorbeeld van een toepassing is het inventariseren van schimmelsoorten in de bodem. Sinds kort is dit instituut ook actief in het toepassen van eDNA. Momenteel lopen er twee projecten.

Waterkever

In opdracht van de Stichting European Invertebrate Survey (EIS)-Nederland voert Naturalis een analyse uit naar de aanwezigheid van de Brede geelgerande waterkever (*Dytiscus latissimus*). Dit is een strengbeschermde soort uit de Habitatrictlijn. Met behulp van exemplaren uit de eigen collectie en buitenlands materiaal worden soortspecifieke primers ontwikkeld. Vervolgens zullen deze ingezet worden voor de analyse van watermonsters.

Macrofauna Kaderrichtlijn Water

Naturalis voert een pilotproject uit om indicatorsoorten te kunnen vaststellen die een rol spelen in beoordelingssystemen voor de Europese Kaderrichtlijn Water. De focus hierbij ligt op macrofauna. Door EIS-Nederland worden zoveel mogelijk van deze soorten vers verzameld, voor de opbouw van een referentiedatabase met DNA barcodes voor soortidentificatie. De watermonsters zullen geanalyseerd worden via next-generation sequencing (zie paragraaf 4.3.2), dus niet met behulp van soortspecifieke primers. Hiervoor heeft Naturalis recent een Ion Torrent aangeschaft.

KWR (WATERCYCLE RESEARCH INSTITUTE)

Binnen het Watercycle Research Institute (KWR) wordt op meerdere fronten onderzoek gedaan naar de eDNA-methode. Zo wordt er gewerkt aan het ontwikkelen van analyseprotocollen en wordt onderzoek gedaan naar de gevoeligheid van de methode, de houdbaarheid van eDNA en de detectiekans. De concentratie eDNA in het water wordt gekwantificeerd met behulp van realtime PCR (qPCR). In elk watermonster dat men analyseert, wordt het rendement van de DNA-extractie en mogelijke inhibitie van de PCR door storende componenten uit het monsters, gekwantificeerd. De detectie van de interne controle vindt tegelijk met de specifieke PCR in een multiplex qPCR experiment plaats (B. Wullings persoonlijke mededeling). KWR is onlangs een pilot gestart met het Waterschap Rivierenland en Bureau Waardenburg.

IMARES WAGENINGEN UR

Binnen het onderzoeksinstituut IMARES wordt ook onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om organismen te inventariseren met behulp van moleculair-biologische technieken. De aandacht gaat daarbij vooral uit naar de detectie van mariene macrobenthossoorten. De technieken waarmee gewerkt wordt zijn onder andere pyrosequencing en meta-barcoding (H. van Pelt persoonlijke mededeling).

3.4.2 ONDERZOEKERS IN EUROPA**INSTITUUT VOOR NATUUR- EN BOSONDERZOEK (INBO), BRUSSEL, BELGIË**

Binnen het Instituut voor Natuur- en bosonderzoek (INBO, België) is middels een pilot-studie naar de verspreiding van de Kamsalamander inzicht verkregen in de detectiekansen, gevoeligheid en toepasbaarheid van de eDNA methode. Hierbij is de eDNA methode vergeleken met de klassieke inventarisatiemethode (fuike). Op termijn wil het INBO de eDNA-methode gaan inzetten voor de detectie van meerdere soorten (amfibieën en vissen). Momenteel wordt gewerkt aan een projectvoorstel dat verder onderzoek aan de eDNA methode en de toepassingen ervan mogelijk moet maken. Daarnaast werkt het instituut aan de inrichting van een laboratorium speciaal voor het analyseren van eDNA materiaal (P. Breyne persoonlijke mededeling).

SPYGEN, LE BOURGET DU LAC, FRANKRIJK

Spygen is een Frans onderzoekslaboratorium dat primers heeft ontwikkeld voor meerdere soorten vissen en amfibieën. Daarmee onderzoeken ze de verspreiding van zeldzame soorten of exoten. Daarnaast passen ze op DNA gebaseerde methoden toe in onderzoek naar de voedselkeuze van dieren en naar de echtheid of herkomst van producten.

Spygen werkt voortdurend aan nieuwe toepassingen van (e)DNA. Het bedrijf heeft een samenwerkingsovereenkomst met RAVON. Zie voor meer informatie www.spygen.fr.

CENTRE FOR GEOGENETICS, NATURAL HISTORY MUSEUM OF DENMARK, UNIVERSITY OF COPENHAGEN, DENEMARKEN

Binnen dit instituut zijn meerdere onderzoekers actief op het gebied van de toepassing van eDNA voor de detectie van aquatische organismen, met name amfibieën, vis en zoogdieren in zoetwater en het mariene milieu. Recente publicaties zijn Foote *et al.* (2012) en Thomsen *et al.* (2012a, b).

LABORATOIRE D'ÉCOLOGIE ALPINE, UNIVERSITÉ GRENOBLE I, FRANKRIJK

Medewerkers van dit laboratorium zijn betrokken bij onderzoek naar de toepassing van eDNA. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met het gelijknamige laboratorium van de Universiteit van Savoie. Hieraan zijn meerdere medewerkers van Spygen verbonden.

3.4.3 ONDERZOEKERS IN AMERIKA EN AZIË**RESEARCH INSTITUTE FOR HUMANITY AND NATURE, KYOTO, JAPAN**

Hebben onderzoek gedaan naar het bepalen van de soortensamenstelling van visgemeenschappen via eDNA (Minamoto *et al.* 2012b), naar de relatie tussen hoeveelheid eDNA en visbiomassa (Takahara *et al.* 2012) en naar de aanwezigheid van een invasieve vissoort (Takahara *et al.* 2013).

CENTER FOR AQUATIC CONSERVATION, UNIVERSITY OF NOTRE DAME, NOTRE DAME, VERENIGDE STATEN

Passen eDNA toe in onderzoek naar de verspreiding van zeldzame soorten en exoten (Jerde *et al.* 2011, 2013; Lodge *et al.* 2012).

FISH AND WILDLIFE RESOURCES, UNIVERSITY OF IDAHO, MOSCOW, VERENIGDE STATEN

Passen eDNA toe in de monitoring van amfibieën, omdat deze dieren vaak moeilijk te detecteren zijn met behulp van conventionele methoden (Goldberg *et al.* 2011). Hebben de methode ook gebruikt voor het vroegtijdig detecteren van een invasieve zoetwaterkieuwslak (Goldberg *et al.* 2013). Zijn bezig met de ontwikkeling van een algemeen protocol voor de bemonstering van eDNA, om houvast te geven aan onderzoekers en beheerders die de techniek willen inzetten voor de monitoring van aquatische organismen.

ROCKY MOUNTAIN RESEARCH STATION, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOREST SERVICE, MISSOULA, MONTANA, VERENIGDE STATEN

Hebben onderzoek gedaan naar specificiteit van primers bij het onderscheiden van twee nauwverwante riviervissoorten. Vergeleken detectiekansen door PCR en qPCR bij zeer lage eDNA concentraties.

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL CONSERVATION, UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS, VERENIGDE STATEN

Werken samen met het Rocky Mountain Research Station (zie hierboven).

DIVISION OF BIOLOGICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF MONTANA, MISSOULA, MONTANA, VERENIGDE STATEN

Werken samen met het Rocky Mountain Research Station (zie hierboven).

DEPARTMENT OF FISHERIES, WILDLIFE, & CONSERVATION BIOLOGY, MINNESOTA AIS RESEARCH CENTER, UNIVERSITY OF MINNESOTA, SAINT PAUL, MINNESOTA, VERENIGDE STATEN

Werken met Karper als modelsoort. Gebruiken qPCR om relatie tussen eDNA concentratie en karperdichtheid te bepalen. Gaan experimenten doen om de effecten van omgevingsfactoren op eDNA flux en de afbraaksnelheid te bepalen.

DEPARTMENT OF BIOLOGY, INSTITUTE FOR GREAT LAKES RESEARCH, CENTRAL MICHIGAN UNIVERSITY, MOUNT PLEASANT, MICHIGAN, VERENIGDE STATEN

Werken aan in de Verenigde Staten exotische karpersoorten in rivieren. Relateren de dichtheid van de vissen in een bepaald stuk van de rivier aan het percentage van de genomen watermonsters met een positieve PCR detectie.

U.S. ARMY ENGINEER RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER, VICKSBURG, MISSISSIPPI, VERENIGDE STATEN

Gebruiken PCR voor het aantonen van invasieve exotische zoetwatermossels, Driehoeksmos- sel en Quaggamosel, in het stroomgebied van de Mississippi. Vergelijken detectiekansen bij twee verschillende monstervolumes. Testen een middel om DNA van levende cellen (in dit geval veligerlarven van de mossels) te onderscheiden van dat van dode cellen, zoals eDNA.

SAMENWERKINGSVERBAND: U.S. ARMY CORPS OF ENGINEERS ERDC ENVIRONMENTAL LABORATORY / U.S. ARMY CORPS OF ENGINEERS GREAT LAKES AND OHIO RIVERS DIVISION / U.S. GEOLOGICAL SURVEY / U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE

Voeren de driejarige *Environmental DNA Calibration Study (ECALS)* uit, ten behoeve van een beter begrip en interpretatie van de detectie van invasieve Aziatische karpersoorten met behulp van eDNA.

AQUATIC RESEARCH AND DEVELOPMENT SECTION, ONTARIO MINISTRY OF NATURAL RESOURCES, PETERBOROUGH, ONTARIO, CANADA

Gebruiken PCR voor onderzoek aan tweekleppigen en vissen, zowel inheemse trekvis als inva- sieve exoten. Relateren detectiekans aan afstand tot de bron (ongepubliceerd).

3.5 WELKE SOORTEN?

In Tabel 1 staat aangegeven voor welke in Nederland voorkomende soorten primers zijn ont- wikkeld door de in paragraaf 3.4.1 genoemde partijen. In totaal gaat het om twintig soorten en daarnaast een aantal stammen van potentieel toxische blauwalgen. Dat is de stand per 1 juli 2013. Van veel soorten gewervelde dieren zijn de sequenties bekend en kan men betrek- kelijk snel bruikbare primers ontwikkelen en valideren. Het aantal soorten dat met behulp van eDNA gedetecteerd kan worden, kan daarom in korte tijd snel groter worden. Soms wor- den primers voor soortgroepen ontwikkeld, zoals voor steur.

TABEL 1 IN NEDERLAND VOORKOMENDE SOORTEN WAARVOOR PRIMERS ZIJN ONTWIKKELD (STAND PER 1 JULI 2013)

RAVON/Spygen	Koeman en Bijkerk/Sylphium	KWR (Watercycle Res Inst)	Naturalis
Grote modderkruiper	Rivierprik	Grote modderkruiper	<i>Dytiscus latissimus</i>
Knoflookpad	Kwabaal	Kamsalamander	
Kamsalamander	Steur	Rivierkreeft	
Amerikaanse brulkikker	Snoek	Blauwalgen (diverse stammen)	
Rode Amerikaanse rivierkreeft	Tilapia		
Groene glazenmaker	Blankvoorn		
Bunzing	Kamsalamander		
Waterspitsmuis	Vuursalamander		
Noordse woelmuis	Heikikker		
<i>Trichobilharzia sp.</i>	<i>Trichobilharzia ocellata</i>		

3.6 KOSTEN

Welke kosten kan een opdrachtgever verwachten voor een inventarisatie op basis van eDNA? In deze paragraaf geven we een raming van de prijs waarvoor analyses aangeboden kunnen worden. Deze prijs is inclusief primers, validatie en controlestappen.

BEMONSTERING

De bemonsteringskosten zullen uiteen kunnen lopen en vooral worden bepaald door de afstand tot het gebied, de onderlinge afstand van de meetpunten en de wijze van monstername. De kosten per monster nemen snel af met een toenemend aantal monsters. Kosten voor een kwartier bemonsteren zijn al gauw 80 Euro, inclusief voorbereiding, reistijd, en materiaalkosten. In deze tijd kan men één tot tien monsters nemen. De kosten voor twee uur bemonsteren variëren van 250 tot 500 Euro, afhankelijk van de inzet van een boot en daarmee een tweede man. Hierbij kan men al gauw tachtig monsters nemen.

Voor het bemonsteren van stromende wateren kan men kiezen voor het per meetpunt filteren van grotere hoeveelheden water, in plaats van meerdere meetpunten te bemonsteren. Hierdoor kan men de detectiekans (zie paragraaf 4.5) vergroten, zonder het aantal monsters toe te laten nemen. Echter, hoe groter het volume water dat men bij de monsternamen wil filteren, hoe meer tijd men kwijt is aan de bemonstering en dus aan bemonsteringskosten.

ANALYSE

In Tabel 2 presenteren we de kosten voor analyses gericht op één soort en voor analyses gericht op de gelijktijdige detectie van een veelheid aan soorten, bijvoorbeeld alle zeventig in Nederland voorkomende vissoorten. Voor elk type analyse onderscheiden we vier technieken, die verschillen in de aard van de informatie die zij opleveren. De technieken worden uitgebreider besproken in hoofdstuk 4.

Let wel: de PCR-technieken kunnen alleen soorten aantonen waarvoor gevalideerde primers ontwikkeld zijn. Dit noemen we de doelsoorten. En: als van een doelsoort geen eDNA in het monster aanwezig is, hoeft dat nog niet te betekenen dat hij niet in het waterlichaam voorkomt. Voor de nieuwe techniek pyrosequencing zijn geen soortspecifieke primers nodig, maar volstaan generieke (algemene) primers. Wel moeten alle sequenties bekend zijn van de te detecteren soorten. De kosten voor de opwerking van een monster zijn gelijk voor alle technieken en bedragen 45,- Euro per monster van twee liter. Het maakt niet uit of dit een enkelvoudig, of een samengesteld monster is.

De kosten voor de gelijktijdige analyse van meer dan één, maar minder dan zeventig soorten liggen voor de PCR-technieken in tussen de bedragen genoemd in Tabel 2. Dit geldt niet voor pyrosequencing. De kosten voor deze techniek zijn vrijwel onafhankelijk van het aantal soorten dat ermee aangetoond moet worden. Let wel: de kosten per monster kunnen beduidend lager worden, naarmate men meer monsters aanlevert. Allerlei handelingen, waaronder het inzetten van controles, kunnen dan efficiënter uitgevoerd worden, waardoor de handelings-tijd per monster sterk afneemt.

TABEL 2 SPECIFICATIE VAN DE KOSTEN VOOR DE ANALYSE VAN ÉÉN MONSTER OP DE AANWEZIGHEID VAN ÉÉN SOORT OF ZEVENTIG SOORTEN, MET EEN KORTE AANDUIDING VAN DE INFORMATIE DIE DE VIER TECHNIEKEN OPLEVEREN

Omschrijving	PCR	PCR sequentie	qPCR	Pyrosequencing
Voor één soort				
Totale kosten per monster	155	180	225	n.v.t.
Voor zeventig soorten				
Opwerking en coaten well plaat	90	90	130	45
PCR uitvoeren	80	80	330	80
Herkenning PCR-producten	150	620	-	1750
Data-analyse en rapportage	70	70	240	500
Totale kosten per monster	390	860	700	2375
PCR	Het aantonen van alle doelsoorten die in het monster voorkomen; determinatie impliciet bevestigd door gebruik gevalideerde primers			
PCR sequentie	Het aantonen van alle doelsoorten die in het monster voorkomen; determinatie expliciet bevestigd door middel van sequentie-analyse			
qPCR	Het aantonen van alle doelsoorten die in het monster voorkomen, met een maat voor hun relatieve abundantie; determinatie impliciet bevestigd door gebruik gevalideerde primers			
Pyrosequencing	Het aantonen van alle soorten die in het monster voorkomen, mits aanwezig in de soortenbibliotheek, met een maat voor hun relatieve abundantie; determinatie expliciet bevestigd door middel van sequentie-analyse			

4

DE EDNA-METHODE IN DETAIL

Het onderzoeken van de aanwezigheid van doelsoorten in oppervlaktewater door middel van eDNA, kortweg de eDNA-methode, omvat twee fasen:

- 1) het nemen van watermonsters en
- 2) de analyse: het opwerken van het eDNA dat in de watermonster aanwezig is, teneinde doelsoorten aan te kunnen tonen.

In de literatuur komt men verschillende strategieën tegen voor het nemen van de watermonsters en verschillende methoden voor het opwerken van het eDNA. Hieronder geven we een overzicht.

4.1 BEMONSTERINGSTRATEGIE

VOLUME

Het ligt voor de hand te veronderstellen dat de kans op het vinden van het gewenste eDNA (de detectiekans) toeneemt met de grootte van het bemonsterde volume water.

In het algemeen verzamelt men relatief kleine hoeveelheden water, waarbij het volume varieert van vijftien milliliter tot twee liter (Blanchet 2012). In ten minste vier onderzoeken aan amfibieën, slakken, tweekleppigen en vissen, alle uitgevoerd in stromende wateren, was echter sprake van grotere monstervolumes, namelijk vier, vijf, zes en tien liter (Goldberg *et al.* 2011, 2013; Lance & Carr 2012; Wilcox *et al.* 2013). Tien liter is ook het aanbevolen volume volgens het door Sylphium ontwikkelde protocol voor bemonstering van de zwemmersjeuk veroorzakende parasiet *Trichobilharzia*, in stagnante wateren (Wanink *et al.* 2013). Volgens sommigen zal de gevoeligheid van de eDNA-methode niet veel groter worden bij volumes boven de twee liter. Vermoedelijk geldt dit niet voor stromende wateren waarin, afhankelijk van de stroomsnelheid, het eDNA sterk verdund zal worden waardoor de detectiekans flink zal afnemen. De detectiekans van eDNA van Canadese riviervissen nam af met toenemende afstand stroomafwaarts van de bron (C. Wilson ongepubliceerde gegevens in Wilson & Wright 2013). In een rivier in de Verenigde Staten was de detectiekans van Driehoeksmossel eDNA in monsters van tien liter 75% groter dan in monsters van twee liter (Lance & Carr 2012). Dit werd toegeschreven aan het grotere monstervolume. Wilcox *et al.* (2013) zeggen dat door het gebruik van grote monstervolumes de kans op vals negatieve resultaten wordt verkleind.

RUIMTELIJKE VERDELING

Voor de detectiekans is niet alleen het monstervolume van belang, maar ook, en misschien zelfs vooral, de plaats waar de monsters genomen worden. Om de bemonstering zo representatief mogelijk te laten zijn kiezen sommigen ervoor om meerdere kleine monsters te nemen op verschillende meetpunten en waterdiepten. Deze monsters van bijvoorbeeld vijftig milliliter worden vervolgens samengevoegd tot één mengmonster van bijvoorbeeld 1,5 liter (Thomsen *et al.* 2012b). Met deze strategie verhoogt men de detectiekans ten opzichte van een

bemonstering waarbij slechts op één meetpunt een watermonster wordt genomen, ook al heeft dit monster een groter volume. De meetpunten waarop men monsters neemt kunnen op regelmatige afstand van elkaar gekozen worden (onafhankelijk van lokale habitatkenmerken), zodat men het waterlichaam homogeen bemonstert.

Om de kans op detectie zo groot mogelijk te laten zijn, kan men ook gebruik maken van kennis omtrent de habitatkeuze van de doelsoort(en) en de monsters verzamelen op de meest kansrijke locaties. Dit vraagt soortenkennis en veldervaring, die met de hierboven omschreven bemonsteringsstrategie met een verdeling van meetpunten niet nodig is. Ook de 'kansrijk-habitatstrategie' vertrouwt natuurlijk op enige verspreiding van DNA-bevattende deeltjes in het water en op de lage detectiegrens van de eDNA-methode.

VRAGEN TER OPTIMALISATIE

De vraag is of men in alle omstandigheden en bij alle diersoorten kan vertrouwen op een snelle verspreiding van hun DNA in het milieu? En een vraag die hiermee samenhangt: hoe dicht zou het net van homogeen verdeelde meetpunten moeten zijn voor een representatieve bemonstering. Om deze vragen te kunnen beantwoorden is meer inzicht nodig in de uitscheiding, afbraaksnelheid en verspreiding van eDNA, voor verschillende organismen, in verschillende aquatische milieus (stromende en stagnante wateren) en bij verschillende temperaturen (seizoen). Alleen met dat inzicht kunnen detectiekansen afgeleid worden en bemonsteringsstrategieën geoptimaliseerd worden. In paragraaf 4.5 gaan we dieper in op dit belangrijke aspect detectiekans.

4.2 MONSTERBEHANDELING

Na monsterneming moet men voorkomen dat het DNA door bacteriën wordt afgebroken. De preventieve actie daartoe dient zo snel mogelijk na de bemonstering genomen te worden. Als preventieve actie kan men het monster invriezen bij -18 °C.

Bij de bemonstering van *Trichobilharzia ocellata* (de veroorzaker van zwemmersjeuk) wordt het filter met aanhangend filtraat direct na de monsterneming overgebracht in 70% alcohol (Wanink *et al.* 2013). Dat laat het DNA intact, maar stopt alle bacteriële afbraak en activiteit van hogere organismen.

Het tussentijds gekoeld opslaan van monsters in een koelbox is onvoldoende preventief; koelen vertraagd de afbraak maar voorkomt het niet. Wilson & Wright (2013) zeggen dat ongefilterde monsters koud gehouden moeten worden (zij gebruiken een koelbox) en zo snel mogelijk gefilterd en ingevroren. De ongefilterde monsters kunnen volgens hen wel een nacht in de koelkast worden bewaard, maar niet langer.

4.3 ANALYSE

De analyse van het eDNA monster omvat drie opeenvolgende stappen:

- 1) het extraheren van het eDNA;
- 2) het vermeerderen (amplificeren) van het DNA van de doelsoort(en);
- 3) het herkennen (determineren) van het DNA van de doelsoort(en).

Bij het gebruik van gevalideerde primers wordt alleen het DNA van de doelsoort(en) vermeerderd, dus zit het 'herkennen' deels al in stap 2. Stap 3 omvat het visueel aantoonbaar maken van dit herkende DNA, door middel van gel-elektroforese of sequentie-analyse. Voor elke stap bestaan meerdere technieken. Hieronder beschrijven we deze. En ten slotte moet een goede analyse ook controles omvatten, om te voorkomen dat een onterecht resultaat (vals positief of vals negatief) geboekt wordt.

4.3.1 HET EXTRAHEREN VAN EDNA

Het extraheren van eDNA uit watermonsters gebeurt in twee stappen. De eerste stap bestaat uit het concentreren van het monster tot een werkbaar volume: het concentraat. In de tweede stap zuivert men het DNA uit het concentraat.

Voor het concentreren zijn twee methoden beschreven: 1) centrifugatie en 2) filtratie. Centrifugatie kan men alleen gebruiken voor kleine volumina monster (maximaal 30 ml). Na toevoeging van 3 volumes ethanol en 1/10 volume natriumacetaat (maximaal 90 ml) aan het watermonster, zullen naakt DNA, celmateriaal en andere aanwezige deeltjes bij centrifugatie een pellet vormen. Hieruit kan het eDNA verder opgezuiverd worden (Ficetola *et al.* 2008; Dejean *et al.* 2011; Foote *et al.* 2012; Thomsen *et al.* 2012b).

Met filtratie kan men grotere volumina monster concentreren (Jerde *et al.* 2011; Thomsen *et al.* 2012a, b; Takahara *et al.* 2012).

Voor de verdere opzuivering van het DNA uit het geconcentreerde monster maakt de wijze waarop het monster geconcentreerd is niet uit. Onder opzuivering verstaat men het isoleren van DNA uit de pellet of het materiaal dat op het filter achterblijft. Voor deze opzuivering zijn meerdere kits op de markt verkrijgbaar (onder andere: Qiagen, MoBio). Voor de werking van deze kits verwijzen wij naar de betreffende gebruikershandleiding.

4.3.2 HET VERMEERDEREN EN HERKENNEN VAN DOELSOORT DNA

Om doelsoort DNA in een watermonster aan te kunnen tonen, zal dit DNA eerst moeten worden vermeerderd. In de wetenschap wordt dit aangeduid met de term amplificatie. Amplificatie (vermeerdering) van doelsoort DNA is nodig omdat dit DNA in het watermonster in minieme en dus niet zichtbaar te maken hoeveelheden voorkomt. Door het doelsoort DNA eerst te amplificeren via de Polymerase Chain Reaction (PCR), kan het vervolgens met behulp van gel-elektroforese of sequentieanalyse zichtbaar gemaakt en geïdentificeerd worden. Hiervoor bestaan momenteel drie technieken die hieronder besproken worden.

STANDAARD PCR

Met behulp van een soortspecifieke primer (in feite gaat het om een primerpaar) en de standaard PCR-methode kan men aan de hand van het eDNA in een monster aantonen of een doelsoort in het monster aanwezig, dan wel afwezig is. Met de soortspecifieke primer vernigvuldigt de PCR uitsluitend het DNA van de doelsoort tot hoeveelheden die via gel-elektroforese of sequentie-analyse te herkennen zijn. De standaard PCR-methode geeft echter geen informatie over de hoeveelheid organismen (aantal of biomassa), noch over leeftijd, lengte en andere individuele kenmerken.

QPCR

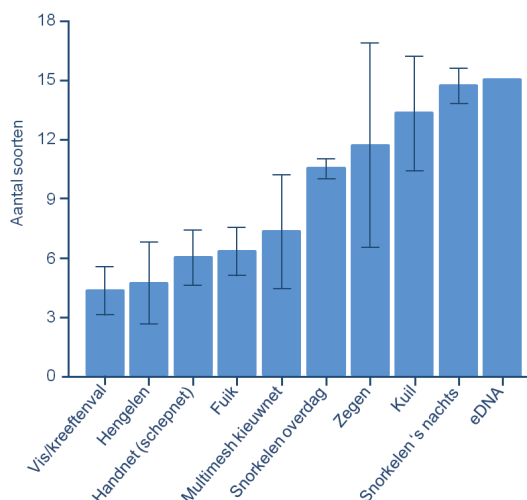
Met qPCR is het mogelijk om ook het aantal in het monster aanwezige DNA moleculen van de doelsoort(en) te bepalen. Hieruit kan vervolgens de biomassa van de aangetroffen soorten berekend worden, wanneer men de beschikking heeft over betrouwbare omrekeningsfactoren. Het onderzoek hiernaar is momenteel in volle gang en er worden vorderingen gemaakt (zie paragraaf 4.6).

HIGH THROUGHPUT SEQUENCING (PYROSEQUENCING OF NEXT GENERATION SEQUENCING)

Pyrosequencing is een high throughput sequentie techniek, waarbij al het aangeboden geamplificeerde DNA afgelezen wordt. Door voor de analyse een soortspecifiek stuk DNA te kiezen (bijvoorbeeld CO1 of CytB gen), kan de soortensamenstelling van de gehele gemeenschap bepaald worden, voor zover vertegenwoordigd in het monster en als alle soortspecifieke sequenties bekend zijn. Deze techniek is tot nu toe slechts één keer toegepast in de aquatische ecologie (Thomson *et al.* 2011). In dit onderzoek van mariene monsters werden 20 315 sequenties bepaald. Hieruit konden vijftien vissoorten geïdentificeerd worden. Dit onderzoek gaf een beter beeld van de diversiteit dan de gebruikte conventionele methoden (Figuur 3). Een correlatie tussen de aanwezige biomassa en het aantal reads (verkregen sequenties) kan nu nog niet gemaakt worden, maar behoort in de toekomst wellicht tot de mogelijkheden.

FIGUUR 3

VERGELIJKING VAN HET AANTAL AANGETOONDE VISSOORTEN TUSSEN DE EDNA-TECHNIEK (PYROSEQUENCING) EN CONVENTIONELE VANGMETHODEN. DE EFFECTIVITEIT VAN SNORKELN IS AFHANKELIJK VAN DE KENNIS VAN DE PERSOON OP HET GEBIED VAN VISIDENTIFICATIE; ZEGEN- EN KUILVISSERIJ ZIJN ALLEEN MOGELIJK BIJ EEN GESCHIKTE BODEM. NAGETEKEND EN VERTAALD NAAR: THOMSEN *ET AL.* 2012A



Om een gehele soortgroep zoals vis te inventariseren, zal pyrosequencing een belangrijke techniek kunnen worden. Op dit moment is deze techniek nog te kostbaar (zie paragraaf 3.6) om ingezet te worden voor kleinschalig gebruik in de hydrobiologische monitoring. Een goed alternatief hiervoor is soortspecifieke detectie via PCR. Via deze methode kunnen simultaan alle vissoorten in één monster worden geïdentificeerd.

4.4 CONTROLES

De methode is gevoelig voor contaminatie. De kans op verontreiniging met DNA van elders moet men minimaliseren met voorzorgsmaatregelen bij de bemonstering. Ook in de analysefase treft men voorzorgsmaatregelen en voert men speciale controles uit die ons moeten wijzen op contaminaties.

Om de kans op kruiscontaminaties te minimaliseren, worden de afzonderlijke handelingen zoals filtratie, DNA isolatie, PCR en gel-analyses, in afzonderlijke ruimtes uitgevoerd. Omdat men met zeer gevoelige technieken te maken heeft, is het van belang om onder zeer schone en strikte omstandigheden te werken om het optreden van (kruis)contaminatie van de watermonsters te voorkomen.

De monsters (in duplo) worden gefilterd over een glasmicrovezelfilter in het lab. Per raster/duplo wordt één van de twee filters bewaard als een backup. Het andere filter wordt gebruikt voor de daadwerkelijke analyse. Een negatieve filtercontrole wordt per analyse meegenomen om een eventuele kruiscontaminatie aan te kunnen tonen. Aan het gefilterde monster wordt een interne positieve controle toegevoegd. Deze bestaat uit DNA dat per definitie niet van nature in het monster voorkomt en vormt de controle op het succes van de isolatie met de commercieel verkrijgbare DNA isolatiekit. De interne controle kan tevens kwantitatieve informatie verstrekken over het rendement van de DNA extractie en mogelijke inhibitie van de PCR. De negatieve filtercontrole wordt tegelijk met de monsters geïsoleerd. Het uiteindelijke volume van het isolaat is 100 µl. De analyse op basis van PCR wordt uitgevoerd met 10 µl van het isolaat, in triplo. De rest van het isolaat wordt bewaard als backup en voor een eventueel gewenste verdere analyse op hetzelfde monster. Tijdens de PCR analyse wordt een positieve controle in duplo meegenomen, bestaande uit DNA van de te detecteren soort. Ook een negatieve controle wordt in duplo meegenomen. Het PCR product wordt met gel-elektroforese zichtbaar gemaakt. In totaal worden per sample; drie monsters, drie filtercontroles, twee interne isolatiecontroles, twee keer het negatief van de interne isolatiecontroles, twee positieve PCR controles en twee negatieve PCR controles geanalyseerd. Als het resultaat van deze analyses voldoet aan de verwachtingen, kunnen contaminaties uitgesloten worden.

4.5 DETECTIEKANS

Eén molecuul van het juiste DNA in een watermonster is al voldoende om een soort aan te kunnen tonen. De kans om een doelsoort aan te tonen, de detectiekans, is dus gelijk aan de kans om minimaal één molecuul van die doelsoort in het watermonster te krijgen. Hoe groot is deze kans en hoe kunnen we die kans beïnvloeden? Ons gezond verstand zegt ons dat die kans groter wordt naarmate er meer individuen van die doelsoort in de bemonsterde plas aanwezig zijn. En nog weer groter, naarmate die individuen actiever zijn en zich sterker verspreiden over de plas, in plaats van samen te klitten op een kluitje. En ook wij, als bemonsteraars, hebben invloed op die detectiekans. Door te bemonsteren op meerdere punten in de plas verhogen we de detectiekans, vooral in situaties waarbij de verspreiding van de doelsoort zich beperkt tot één hoekje in die plas.

Ten slotte is een aantal fysische factoren direct en indirect van invloed op de detectiekans. Met toenemende watertemperatuur neemt de activiteit van vissen en amfibieën toe en daarmee vermoedelijk ook de hoeveelheid eDNA die zij per tijdseenheid vormen, de eDNA-flux (Takahara *et al.* 2012). Hierdoor stijgt hun detectiekans. Maar als het water warmer wordt, neemt ook de snelheid van de bacteriële afbraak van eDNA toe, waardoor de detectiekans weer daalt. En de waterbeweging, stroming en turbulentie, kunnen de passieve verspreiding van eDNA in het milieu bevorderen. Hierdoor komt het eDNA verder van de plek waar het werd afgescheiden, waardoor de kans om het op enige afstand aan te treffen toeneemt. Maar tegelijkertijd wordt de hoeveelheid eDNA op de afscheidingsplek verdund, waardoor de detectiekans ter plaatse afneemt.

De detectiekans wordt mede bepaald door de lengte van het DNA fragment waaraan de soortspecifieke primers binden. Afbraak van DNA is een geleidelijk proces. Dat wil zeggen, een stuk eDNA wordt in de tijd afgebroken tot steeds kleinere stukjes. Dus hoe korter het DNA fragment is waaraan de soortspecifieke primers binden, des te langer na afscheiding van het eDNA de desbetreffende soort kan worden aangetoond middels de eDNA methode. Hoe dit proces precies verloopt en welke tijdsschalen daarbij horen is nog niet bekend en dient onderzocht te worden.

De detectiekans is moeilijk in zijn algemeenheid te bepalen, maar is wel een heel belangrijke grootheid. Hij zegt iets over de onderzoeksinspanning, waaruit wij af moeten leiden hoe we een negatief resultaat moeten beoordelen. In de wetenschap immers, kan men wel aantonen dat iets er is, maar niet dat iets er niet is. Als iets niet gevonden wordt, kan men niet goed gekeken hebben, of toevallig op de verkeerde punten gemonsterd.

In de wetenschappelijke literatuur is slechts incidenteel aandacht besteed aan het begrip detectiekans. Dit betreft met name de relatie met de temperatuur (Takahara *et al.* 2012) en de ongelijkmatige verspreiding en verdunning van eDNA in stromende wateren (Lance & Carr 2012; Goldberg *et al.* 2013; Wilcox *et al.* 2013). Systematisch onderzoek ontbreekt echter volledig. Wil men op basis van eDNA volwaardige methoden kunnen aanbieden voor de detectie van soorten, dan moet men inzicht krijgen in de bijbehorende detectiekansen en in de wijze waarop deze vergroot kunnen worden door adequate bemonsteringsstrategieën.

De betrouwbaarheid van een meting is de kans dat het resultaat van de meting overeenkomt met de werkelijke waarde. Inzicht in detectiekansen is nodig om de betrouwbaarheid van de eDNA-methode te kunnen vaststellen en optimaliseren. Het karakteriseren van de detectiekansen is dan ook een hoofdprioriteit van het noodzakelijke betrouwbaarheidsonderzoek. In hoofdstuk 6 gaan we hier dieper op in. We willen hier nog wel opmerken dat het optimaliseren van de betrouwbaarheid van de eDNA-methode niet is beperkt tot de opzet van de bemonstering. Een recent gepubliceerd onderzoek toont aan dat heranalyse van de bemonsteringsresultaten met behulp van 'site occupancy models' de betrouwbaarheid kan verhogen (Schmidt *et al.* 2013).

4.6 STAND VAN ZAKEN

SOORTGROEPEN

Voor diverse dieren die in en rond het water leven zijn inmiddels methoden ontwikkeld om ze te detecteren op basis van eDNA. Het gaat om dieren uit de volgende groepen:

- zuigwormen (*Trichobilharzia*; Wanink *et al.* 2013);
- slakken (Goldberg *et al.* 2013);
- tweekleppigen (Lance & Carr 2012);
- insecten (Thomsen *et al.* 2012a; Yu *et al.* 2012; Herder *et al.* 2013);
- kreeftachtigen (Thomsen *et al.* 2012a; Yu *et al.* 2012; Mahon *et al.* 2013a);
- vissen (Jerde *et al.* 2011; Herder *et al.* 2012; Lodge *et al.* 2012; Minamoto *et al.* 2012b; Thomsen *et al.* 2012a);
- amfibieën (Goldberg *et al.* 2011; Olson *et al.* 2012; Dejean *et al.* 2012; Thomsen *et al.* 2012a);
- vogels (Thomsen *et al.* 2012a);
- zoogdieren (Thomsen *et al.* 2012b; Herder *et al.* 2013).

De methoden zijn toegepast in zowel stilstaande als stromende wateren. Ook in mariene milieus blijken de eDNA technieken goed toepasbaar (Foote *et al.* 2012, Thomsen *et al.* 2012a).

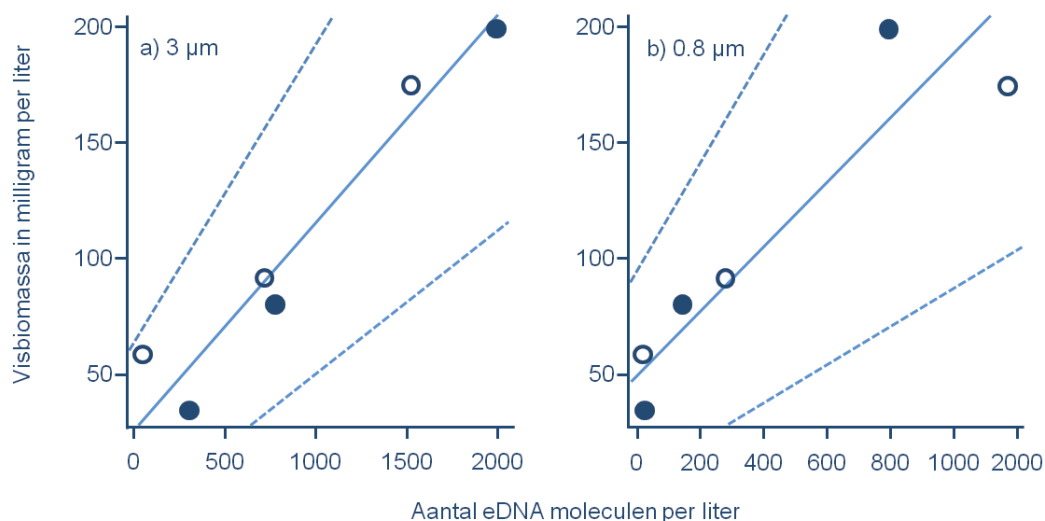
KWANTIFICERING

Er is een begin gemaakt met de kwantificering van numerieke dichtheid en biomassa op basis van metingen van eDNA. In eerste instantie hebben Thomsen *et al.* (2012a) met behulp van qPCR voor larven van een padden- en een salamandersoort een positief verband gevonden tussen de larvendichtheid en de dichtheid van de in de monsters aangetroffen eDNA moleculen. Dit gold zowel voor een aantal plassen waarin de larvendichtheid door middel van schepnetbemonstering was bepaald, als voor mesocosm experimenten waarbij verschillende aantallen larven waren uitgezet. Met name voor de experimenten mag worden aangenomen dat de aanwezige biomassa sterk gecorreleerd was met de larvendichtheid. De eDNA concentratie van de relatief grote paddenlarven was consistent hoger dan die van de salamanderlarven. Behalve biomassa, was hierbij echter ook activiteit een meespelende factor. De paddenlarven waren actiever dan de salamanderlarven, waardoor van de eerste soort een grotere eDNA flux wordt verwacht.

In de Verenigde Staten is voor een invasief slakje uit Nieuw-Zeeland (Jenkins' waterhoren, *Potamopyrgus antipodarum*, ook in Nederland een exoot) eveneens een toename van de hoeveelheid eDNA moleculen in een monster, met toenemende slakkendichtheid gevonden (Goldberg *et al.* 2013). Ook in dit geval ging het om veldonderzoek (in een rivier) en experimenten (in aquaria).

Voor een zetal in de Verenigde Staten exotische karpersoorten kon men de dichtheid in een stuk rivier relateren aan het percentage van de genomen watermonsters die een positieve detectie opleverden (Mahon *et al.* 2013b). Hierbij was de schatting van de vissendichtheid waarschijnlijk zeer goed, omdat alle aanwezige vis werd gedood met het chemische middel Rotenon, waarna de aan de oppervlakte drijvende vissen werden geteld. De watermonsters werden genomen in de twee maanden voorafgaand aan de toepassing van Rotenon. Er lijkt sprake van een niet-lineair verband, maar de beperkte data laten hierover nog geen harde uitspraak toe.

FIGUUR 4 CORRELATIE TUSSEN DE HOEEVEELHEID EN EDNA-MOLECULEN PER LITER EN DE AANWEZIGE VISBIOMASSA. OPEN EN GESLOTEN RONDJES GEVEN VERSCHILLENDE VIJVERS AAN; DE TWEE FIGUREN VERSCHILLEN IN DE PORIEGROOTTE VAN HET FILTER WAARMEE HET EDNA GECONCENTREERD IS: A) PORIEGROOTTE 3 μ M, B) PORIEGROOTTE 0.8 μ M. NAGETEKEND NAAR: TAKAHARA *ET AL.* 2012



In een experiment van Takahara en medewerkers werden karpers met een bekend gewicht in een vijver geplaatst. Vervolgens werd eDNA bemonsterd en de hoeveelheid daarvan bepaald met qPCR. Tussen de hoeveelheid eDNA van de Karper en de totale biomassa in de vijver was een significante correlatie aantoonbaar (Takahara *et al.* 2012; zie Figuur 4). Deze correlatie bleek wel te worden beïnvloed door de watertemperatuur en door het tijdstip na uitzetting van de Karper. Temperatuur beïnvloedt de activiteit van de vis, maar ook de afbraak van eDNA. Het vangen en weer uitzetten van vis zorgt voor stress wat de afscheiding (flux) van eDNA zal kunnen beïnvloeden.

Het is aannemelijk dat nog veel onderzoek nodig is om de juiste conversiefactoren tussen hoeveelheid eDNA en biomassa te bepalen. Naar onze mening is het twijfelachtig of omrekeningsfactoren beschikbaar zullen komen die voldoende betrouwbare biomassagegevens zullen opleveren van complete visgemeenschappen. Niet alleen is er de afhankelijkheid van omgevingsfactoren zoals temperatuur, zuurstofgehalte, seizoen, misschien predatiedruk en scheepvaart, ook is er de afhankelijkheid van soortspecifieke eigenschappen, zoals eDNA-flux, dichtheid en verspreidingsgedrag. Wellicht moeten we niet streven naar een exacte kwantificering, maar naar een indeling in grootte-orden of klassen.

TOEPASSINGEN BUITEN HET WATER

Buiten het aquatische milieu wordt de eDNA technologie ook ingezet om organismen te identificeren aan de hand van DNA dat zij achterlaten. Bijvoorbeeld bij vraat aan planten (Nichols *et al.* 2012). Met eDNA kunnen plantensoorten geïdentificeerd worden, die bezocht worden door bijen voor de productie van honing (Valentini *et al.* 2010). Een zeer recent onderzoek waarbij eDNA technologie ingezet is, is het in kaart brengen van de soortensamenstelling van terrestrische zoogdieren, door een DNA analyse uit te voeren op aasvliegen (Calvignac-Spencer *et al.* 2013). De aasvliegen werden in een bepaald gebied gevangen en vervolgens onderzocht op de aanwezigheid van DNA afkomstig van zoogdieren.

5

WAT KUNNEN WE VERWACHTEN EN WAT NIET

De verwachtingen van de toepassing van eDNA in de biologische inventarisatie en monitoring zijn hooggespannen. De methode wordt een grote doorbraak genoemd, met name voor het onderzoek naar de verspreiding van moeilijk te detecteren aquatische organismen. In dit hoofdstuk zetten we voor- en nadelen op een rijtje, uiteraard voor de huidige stand van zaken en met een genuanceerde blik. Maar we geven ook aan wat men van deze methode mag verwachten in de komende jaren en wat niet.

5.1 DE VOORDELEN

Ten opzichte van traditionele methoden van inventarisatie en monitoring worden de volgende voordelen genoemd van de toepassing van eDNA:

- de methode is non-destructief en roept daardoor geen ethische bezwaren op;
- de methode zou een hogere detectiekans hebben dan traditionele inventarisatiemethodes, met name voor soorten die met de gangbare vangtuigen moeilijk zijn aan te tonen of die zeldzaam heten te zijn;
- de methode heeft een groter onderscheidend vermogen, waardoor de kans op het treffen van een enkel individu van een zeldzame soort in een gemeenschap van algemene soorten groter is dan bij traditionele methoden;
- de methode kan in alle wateren worden toegepast, in tegenstelling tot sommige vangtuigen en bij vis, het elektrovisapparaat;
- de methode zou niet selectief zijn, in tegenstelling tot de inzet van de meeste traditionele vangtuigen;
- de eDNA-methode levert een betrouwbare determinatie van soorten op, zonder dat determinatiekennis en -vaardigheid zijn vereist;
- de juistheid van de determinatie is impliciet onderbouwd door een gevalideerde methode;
- de inventarisatiekosten zouden lager kunnen zijn.

NON-DESTRUCTIEF

Ethische bezwaren doen zich vooral voor bij visbestandopnamen, omdat deze gepaard kunnen gaan met sterfte van gevangen dieren. Maar ook sommige amfibieën moet men in de hand nemen voor een zekere determinatie, wat stress en beschadiging teweeg kan brengen. In ieder geval heeft men voor de traditionele methoden ontheffingen nodig in het kader van de Flora- en faunawet en de visserijregelgeving. Bij toepassing van de eDNA-methode zou dit niet nodig hoeven zijn.

Het non-destructief zijn van de eDNA-methode is ook van toepassing op het habitat. Vissen met schepnet, zegen of kuil leidt gemakkelijk tot verstoring van de leefomgeving, vooral in vegetatierijke wateren. Ook deze verstoring kan men vermijden door toepassing van de eDNA-methode.

FIGUUR 5

HET BINNENHALEN VAN DE STORTKUIL TIJDENS EEN KRW VISSTANDMONITORING



HOGERE DETECTIEKANS

Er zijn meerdere voorbeelden van studies waarbij soorten op basis van eDNA zijn aangetoond op locaties waar ze met gangbare methoden niet werden aangetroffen. De methode kan dus gevoeliger zijn dan conventionele methoden, met name voor soorten die moeilijk te vangen zijn of in lage dichtheid voorkomen (Jerde *et al.* 2011; Thomsen *et al.* 2012a, b; Herder *et al.* 2013).

Een voorbeeld is de vondst van eDNA van de Kwabaal in petgaten in de Weerribben, waar ook fuiken waren uitgezet om dit dier te vangen. De fuiken waren geplaatst op drie locaties rond de Schutsloterwijde. Eén dag na plaatsing zijn in een straal van dertig meter rond elke fuik drie watermonsters genomen voor eDNA analyse. Op één locatie scoorden alle drie de monsters positief op Kwabaal DNA, op de tweede één van de drie monsters, en op de derde locatie geen van de drie monsters. In de fuiken werd vijf weken lang geen enkele Kwabaal gevangen (Koeman en Bijkerk/Sylphium ongepubliceerde gegevens). Hieruit kan men afleiden dat men met fuiken een kleinere kans heeft om de Kwabaal aan te tonen, dan met eDNA. Tevens maakt dit duidelijk dat een enkel watermonster voor eDNA analyse eveneens kan leiden tot een vals negatieve uitslag.

Een ander voorbeeld is de verspreiding van de Grote modderkruiper. Deze vis is moeilijk te vangen met elektrovisserij en schepnet en leeft vaak op plekken waar weinig andere vis zit. Daarom wordt hij weinig gevangen in routinematige visbestandsopnamen waardoor hij het etiket zeldzaam heeft gekregen. Door de inventarisatie van eDNA is dit beeld sterk veran-

derd en blijkt de Grote modderkruiper op veel meer locaties voor te komen dan wij tot voor kort dachten (Herder 2011). De vraag blijft wel hoeveel van deze ‘nieuwe’ locaties ooit eerder onderzocht zijn met traditionele methoden.

ONDSCHIEDEND VERMOGEN

Het is een veronderstelling maar hij lijkt plausibel, dat een enkele Poelkikker te midden van een groep bastaardkikkers (Middelste groene kikker) op basis van eDNA met meer kans van slagen gedetecteerd zal worden, dan op basis van handvangsten en zelfs geluid. Datzelfde geldt voor een Serpeling te midden van een grote vangst Blankvoorn.

TOEPASBAAR IN MEER WATERTYPEN

De meest gebruikte vangmethoden kennen hun beperkingen. Deze beperkingen zijn er niet bij de toepassing van de eDNA-methode. Het actief vissen met een net bijvoorbeeld, of dat nu een zegen is voor vis of een handnet voor amfibieën, wordt moeilijker naarmate het water dichter begroeid is met waterplanten. Niet alleen wordt het zwaarder om het net door het water te bewegen, ook de kans dat dieren aan het net ontsnappen wordt groter zodat het rendement van het net daalt. Het elektrovisapparaat kan niet worden ingezet in wateren met een chloridegehalte hoger dan duizend milligram per liter. Een methode voor een representatieve visbestandsopname van brakke binnenwateren is daarom nog niet echt voorhanden.

NIET SELECTIEF

Alle actieve en passieve vangmethoden zijn in meer of mindere mate selectief, als gevolg van verschillen in gedrag, snelheid en habitatkeuze tussen soorten. Tot op zekere hoogte kunnen verschillen in gedrag ook van invloed zijn op de detectiekans van eDNA. Een dier dat in de loop van een dag de hele plas doorzwemt, zal zijn DNA in sterkere mate verspreiden dan een dier dat op één plek blijft. Afhankelijk van de opzet van de bemonstering zal ook de eDNA-methode in meer of mindere mate selectief kunnen zijn.

GEEN DETERMINATIEKENNIS VEREIST

Een evident voordeel van de eDNA-methode. Taxonomische kennis is overigens wel vereist bij de ontwikkeling en validatie van de methode.

IMPLICIETE ONDERBOUWING

Bij gangbare inventarisaties maakt men foto's van de vangst van een zeldzame soort, om twijfel aan de determinatie te vermijden. In veel gevallen vormt dit een sluitend bewijs dat het om de betreffende soort gaat, niet dat deze soort op de genoemde plek is aangetroffen. Veel andere mogelijkheden heeft men echter niet. Bij de eDNA-methode is het resultaat van de inventarisatie een directe afspiegeling van het analyseresultaat, te weten wel of geen PCR-product van de doelsoorten. Ook bij de eDNA-methode vormt dit echter geen bewijs voor het vóórkomen op de genoemde plek; het monster kan elders genomen zijn..., of het resultaat kan beïnvloed zijn door contaminatie bij onzorgvuldig werken.

LAGERE KOSTEN

In veel gevallen zullen de kosten van de inventarisatie of monitoring lager kunnen zijn bij de inzet van eDNA-methoden, maar in zijn algemeenheid kan daar nog geen uitspraak over gedaan worden. Dat kan pas als we weten hoe we moeten bemonsteren om een gewenste detectiekans te realiseren, voor een specifieke soort of voor een afgebakende groep van soorten. Als dat één monster per hectare is, wordt de eDNA-methode in grotere meren al snel duurder dan de inzet van bestaande technieken.

De analyse zelf leent zich uitermate goed voor (verregaande) automatisering. Naarmate de methode meer zal worden toegepast, zal de automatisering meer en meer zijn intrede doen waardoor de onderzoekskosten zullen dalen.

In een pilotstudie bleek eDNA van Rivierprik larven pas aantoonbaar in monsters verzameld op niet meer dan vijf meter afstand van de plaats waar de larven zaten ingegraven (Koeman en Bijkerk/Sylphium ongepubliceerde gegevens). Een onderzoek naar de verspreiding van Rivierprik larven in bovenlopen zal vermoedelijk een groot aantal monsters vragen. In dit geval zullen het echter niet de kosten zijn om toch te kiezen voor eDNA, maar de wens om deze inventarisatie op een non-destructieve manier uit te voeren.

5.2 DE NADELEN

Ten opzichte van traditionele methoden heeft de huidige toepassing van eDNA ook nadelen:

- de methode levert nog geen kwantitatieve abundantieschatting op in termen van aantal of biomassa per volume- of oppervlakte-eenheid;
- de methode levert geen inzicht op in morfologische eigenschappen van de organismen, zoals lengte, ontwikkelingsstadium, fecunditeit, vitaliteit;
- de bemonsteringsmethode is nog niet voldoende ontwikkeld, in die zin dat nog niet bekend is hoe een bemonstering moet worden opgezet om een bepaalde detectiekans van soorten te kunnen realiseren. Met andere woorden: de betrouwbaarheid van de methode is nog onvoldoende bekend.

KWANTIFICERING

Met behulp van qPCR kan men het DNA van verschillende doelsoorten vermenigvuldigen in een mate die proportioneel is aan de hoeveelheid eDNA die van deze doelsoorten in het monster aanwezig is. Dit zegt nog niets over de populatiegrootte van deze doelsoorten in het water. Voor een individuele soort in een bepaalde situatie kan op eenvoudige wijze een relatie afgeleid worden tussen de concentratie eDNA in het monster en de hoeveelheid biomassa in het water, bijvoorbeeld voor Karper (Takahara *et al.* 2012). Voor een algemene situatie lijkt dat al veel moeilijker, laat staan voor een veelheid aan soorten. Waarschijnlijk zal voor elke soort een correlatie bepaald moeten worden. En zoals verwacht blijkt de watertemperatuur van invloed te zijn op de correlatie. Met toenemende watertemperatuur nam de activiteit van Karper toe en daarmee de concentratie eDNA in de monsters (Takahara *et al.* 2012).

De vraag is of we met de eDNA-methode uit moeten zijn op kwantificering. Voor veel vraagstellingen is dat misschien helemaal niet noodzakelijk. In de huidige vismaatlatten voor de KRW zijn kwantitatieve gegevens belangrijk, maar zijn ze ook echt noodzakelijk voor een kwaliteitsoordeel?

LENGTE EN VITALITEIT

Bij de gebruikelijke visbestandopnamen wordt van elke soort een lengte-frequentieverdeling bepaald en van elk individu de vitaliteit. Beide gegevens spelen een rol in de beoordeling van populatie-dynamische aspecten van visgemeenschappen, zoals rekrutering, voedselgebrek, parasitisme en predatiedruk. Wellicht zijn deze aspecten niet noodzakelijk voor een beoordeling van de ecologische toestand. Ze geven natuurlijk wel inzicht in de wijze waarop populaties functioneren, wat nuttige informatie is voor een adequaat beheer. Via de eDNA methode kan men geen onderscheid maken tussen grote en kleine exemplaren, of tussen een hoge dichtheid aan larven of enkele actieve, volwassen exemplaren.

FIGUUR 6

EEN NADEEL VAN DE EDNA METHODE IS DAT HET GEEN MORFOLOGISCHE INFORMATIE, ZOALS LENGTE EN VITALITEIT, VAN DE DOELSOORT OPLEVERT



VALIDATIE

Uit de wijze waarop de methode is toegepast (en eventueel door wie) moet men de betrouwbaarheid van het resultaat of de meetonzekerheid kunnen afleiden. Omgekeerd moet men in staat zijn om de eisen te formuleren waaraan een methode moet voldoen om een gewenste meetonzekerheid te realiseren. Alleen dan beschikt men over een gevalideerde methode. Klassieke inventarisatiemethoden stellen eisen aan het tijdstip waarop geïnventariseerd wordt, aan het aantal bezoeken, aan de deskundigheid van de waarnemer en aan de in te zetten apparatuur. Deze eisen zijn bedoeld om de kans op vals negatieve waarnemingen of onderschattingen te minimaliseren. Op dit moment weten we nog onvoldoende om deze kans voor toepassingen van eDNA in te kunnen schatten. Om hier meer inzicht in te krijgen, is het van belang dat elk gebruik van de eDNA methode wordt gevalideerd en dat de resultaten van deze validatie al dan niet door middel van een publicatie openbaar worden gemaakt.

5.3 DE MOGELIJKHEDEN VAN EDNA

MOGELIJKHEDEN VOOR HET SOORTENBELEID

Indien er eDNA van een soort in een watermonster aanwezig is, zal de aanwezigheid van deze soort onomstotelijk aangetoond worden. De DNA technieken die daarvoor gebruikt worden (zie hoofdstuk 4) zijn dusdanig gevoelig en soortspecifiek dat daar geen twijfel over bestaat. De mogelijkheden voor het soortenbeleid zijn daarom groot.

De methode wordt vooral gepropageerd voor het detecteren van zeldzame en invasieve soorten, die in lage dichtheden voorkomen. Wij denken dat de eDNA-methode voor dit doel inderdaad superieure mogelijkheden biedt, met de kanttekening dat de kans op vals negatieve resultaten nog niet goed is in te schatten.

Daarnaast moet men voorzichtig zijn met de interpretatie van positieve resultaten, bijvoorbeeld in systemen die gevoed worden met water van elders (zie ook verder in deze paragraaf onder Mogelijkheden voor het waterbeheer). Gebiedsvreemd water bleek ook bij eDNA onder-

zoek aan invasieve Aziatische karpersoorten in de Verenigde Staten een oorzaak van vals positieve resultaten te zijn (ECALS 2013). Daarbij ging het om de rioolafvoer van vismarkten, waarin het gesmolten conserveringsijs van deze consumptievis was terechtgekomen.

Uit het Amerikaanse onderzoek kwamen overigens nog meer vectoren naar voren die vals positieve resultaten veroorzaakten. De belangrijkste hiervan zijn:

- contaminatie door vissersboten en vistuigen, met name netten;
- contaminatie door visetende vogels, zowel direct (vogelpoep in het water) als indirect (vogelpoep op een vaartuig);
- contaminatie door aanvoer van baggerspecie uit gebieden waar de exotische karpersoorten zich al hebben gevestigd.

De kans op vals negatieve resultaten draait om de vraag wat de kans is om één genoom van een soort in je watermonster te krijgen. Deze kans bepaalt de detectiekans van de methode. Inzicht in die kans is nodig om te kunnen komen tot een volwaardige methode (met bekende betrouwbaarheid) voor de inventarisatie van organismen (zie hoofdstuk 6).

FIGUUR 6

VOOR HET DETECTEREN VAN INVASIEVE SOORTEN ZOALS DE PONTISCHE STROOMGRONDEL (*NEOGOBIOUS FLUVIATILIS*) BIEDT DE EDNA METHODE GOEDE MOGELIJKHEDEN



MOGELIJKHEDEN VOOR HET WATERBEHEER

Er zijn goede ervaringen opgedaan met de toepassing van de eDNA-techniek in stromende en stilstaande wateren en in zoete tot mariene wateren.

Zonder inzicht in de detectiekans kan de toepassing van eDNA toch al een aanvulling zijn op de gebruikelijke visstandbemonsteringen. Soorten die met de gebruikelijke vangtuigen moeilijk te vangen zijn, zoals Grote modderkruiper, Kwabaal en Rivierprik, kunnen langs deze weg aangetoond worden. Hetzelfde geldt voor amfibieën. Voor de waterschapsecoloog, die het beheer mede wil evalueren aan de hand van de verspreiding van kwetsbare soorten, biedt dit welkome extra informatie. Voor de beoordeling van de ecologische kwaliteit ten behoeve van de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW), levert deze informatie weinig meerwaarde meer op. De reden is dat bij vis de deelmaatlat 'soorten' met de laatste aanpassing in 2012 is geschrapt

voor stilstaande wateren. Alleen voor stromende wateren is er nog een maatlat die het aantal rheofiele en eurytope soorten evalueert (Van der Molen *et al.* 2012). Amfibieën spelen geen rol in de kwaliteitsbeoordeling voor de KRW.

Het gebruik van de eDNA-methode in stromende wateren biedt verschillende perspectieven voor de waterbeheerder die geïnteresseerd is in de connectiviteit binnen zijn watersysteem. In deze wateren zal het DNA in watermonsters altijd afkomstig zijn van de plek van bemonstering, of van een meer of minder ver stroomopwaarts gelegen locatie. Door een beektraject zo op regelmatige afstanden te bemonsteren, kan men bepalen hoever een bepaalde soort, bijvoorbeeld Winde, stroomopwaarts voorkomt. Deze kennis kan migratieknelpunten aan het licht brengen. Het voorkomen van een anadrome soort als Rivierprik in een beek is indicatief voor een goede connectie tussen zoet en zout water.

In watersystemen die bemalen worden, zoals polders, moet men oppassen met de toepassing van eDNA. Het eDNA in een poldersloot kan geïmporteerd zijn met het ingelaten water, zelfs via een route die onpasseerbaar is voor vis. Evenzo kan eDNA van soorten die leven in een poldersysteem, via het uitgelaten water terecht komen in een boezem, kanaal of rivier.

5.4 DE ONMOGELIJKHEDEN VAN EDNA

Het feit dat eDNA nog geen mogelijkheden biedt om de aantals- of biomassaverhouding binnen complete soortengemeenschappen te meten, maakt de methode vooralsnog ongeschikt voor toepassing in de monitoring voor de Europese Kaderrichtlijn Water (KRW). Dit zou echter kunnen veranderen. Niet zozeer door ontwikkelingen van de methode, maar door veranderde inzichten in de kwaliteitsbeoordeling van wateren.

INTERMEZZO 5.1

In de KRW wordt de ecologische toestand van oppervlaktewater afgemeten aan de taxonomische samenstelling en abundantie van vier kwaliteitselementen:

- 1) fytoplankton;
- 2) macrofyten en fytobenthos;
- 3) benthische ongewervelde fauna (macrofauna);
- 4) vis.

In de normatieve omschrijving van de kwaliteitstoestanden (zie Annex V in EC 2000) worden parameters en criteria genoemd voor de kwaliteitselementen fytoplankton, fytobenthos en macrofauna.

Bij de monitoring van deze organismengroepen wordt een monster genomen uit de gemeenschap, de hierin aanwezige organismen worden gedood en vervolgens gedetermineerd en geteld. Uit de resultaten leidt men af in welke mate de samenstelling en abundantie van de taxa afwijken van de ongestoorde toestand. Het is denkbaar dat het determineren en kwantificeren op de duur via het barcoding principe plaatsvindt, waarbij een relatieve abundantiebepaling wordt gemaakt.

TOEPASBAARHEID IN DE KRW

De biologische monitoring voor de Europese Kaderrichtlijn Water moet inzicht geven in de mate waarin de taxonomische samenstelling en de abundantie van taxa afwijken van de onverstoorte toestand (EC 2000). Dit geldt voor alle vier onderscheiden kwaliteitselementen: fytoplankton, overige vegetatie, macrofauna en vis. Zolang het niet mogelijk is om via eDNA de abundantie in het veld voldoende betrouwbaar te kwantificeren, is het onmogelijk om de huidige methoden volledig door eDNA-technieken te vervangen. Voor vis wordt aanvullend ook informatie gevraagd over de leeftijdsopbouw (lengteverdeling) binnen populaties en deze is op geen enkele wijze uit DNA-onderzoek af te leiden.

PERSPECTIEVEN

De toepasbaarheid van eDNA in de monitoring van macrofauna en vis zal kunnen toenemen als de opzet van de KRW-monitoring verandert (bijvoorbeeld jaarlijks kwalitatief en eens in de zes jaar ook kwantitatief) of de referentietoestand onvoldoende beschreven kan worden in termen van abundantie van taxa. In het laatste geval zou men dan kunnen volstaan met deelmaatlaten die de diversiteit beoordelen, of de verhouding tussen het aantal storingsgevoelige soorten en het aantal tolerante soorten.

Meerdere instanties, waaronder RAVON/Spygen, voeren momenteel onderzoek uit naar het meten van biomassa en dichtheid op basis van eDNA. Met onze huidige inzichten lijkt het ons een onmogelijke opgave om betrouwbare conversiefactoren af te leiden voor gemiddelde situaties in het veld en door de seizoenen. Voor individuele soorten, bijvoorbeeld invasieve exoten, zal deze opgave eenvoudiger zijn dan voor een veelheid aan soorten, zoals visgemeenschappen. Maar wellicht is de praktijk voorspelbaarder dan wij nu denken. Nader onderzoek moet hier inzicht in geven.

6

WAT IS NODIG VOOR EEN VOLWAARDIGE METHODE?

6.1 VOORWAARDEN

Een volwaardige meetmethode op basis van eDNA moet aan de volgende voorwaarden voldoen:

- 1) het is bekend welke stappen en externe factoren een cruciale invloed hebben op de nauwkeurigheid van de meting;
- 2) het is bekend hoe de betrouwbaarheid van de meting vergroot kan worden;
- 3) de methode is geoptimaliseerd voor een goede prijs/kwaliteit-verhouding;
- 4) er is een werkvoorschrift of protocol dat de uitvoering standaardiseert.

In dit hoofdstuk geven we een opzet voor onderzoek om aan deze voorwaarden te kunnen voldoen. Tevens presenteren we een raming van de kosten.

INTERMEZZO 6.1

De nauwkeurigheid van een meetmethode wordt bepaald door de betrouwbaarheid en de precisie van de resultaten. De betrouwbaarheid is de mate waarin de meetresultaten de realiteit weerspiegelen, of, met andere woorden, de kans dat een gemeten waarde representatief is voor de werkelijke waarde. De precisie is de mate waarin de gemeten waarden met elkaar overeenkomen, wanneer de meting meerdere malen wordt uitgevoerd in dezelfde situatie en door dezelfde onderzoeker.

Herhaalbaarheid is een uitdrukking van de precisie: hoe stemmen de resultaten van meting en hermeting overeen. Reproduceerbaarheid is de mate waarin het resultaat van andere onderzoekers vergelijkbaar is met die van ons, wanneer zij overeenkomstige metingen doen met deze methode.

6.2 ONDERZOEK NAAR BETROUWBAARHEID

De betrouwbaarheid van de meting wordt bepaald door de kans om een stukje eDNA van de doelsoort in het monster te krijgen. Deze kans hebben wij de detectiekans genoemd. Wij verwachten dat de detectiekans soortafhankelijk is en verder vooral afhankelijk van de watertemperatuur (paragraaf 4.6). Waar het om draait, is de vraag hoe ver en in welke richtingen het eDNA zich in de omgeving verspreidt, tussen het moment van afscheiding door het dier en het moment van afbraak door micro-organismen.

Deze vraag zouden we kunnen beantwoorden met een grote hoeveelheid onderzoek, experimenteel in het lab en in situ in het veld. Eleganter en efficiënter is om te beginnen met een modelmatig onderzoek naar de factoren die de verspreiding van eDNA in hoofdzaak bepalen

en de uitersten hierin waarmee we rekening zouden moeten houden. Mogelijk moeten sommige parameters in het model nog door experimenteel onderzoek ingeschat worden, voordat de simulaties voldoende realistisch zijn. Maar dan kunnen we op basis van het theoretische inzicht in de mogelijke verspreidingsscenario's van het eDNA, in het veld gaan onderzoeken welke scenario's onder welke omstandigheden werkelijkheid zijn. Met deze kennis kunnen wij ten slotte optimale bemonsteringsstrategieën ontwerpen.

Een zeer recente publicatie (Schmidt *et al.* 2013) toont de kracht van modelonderzoek in het kader van de betrouwbaarheid van de eDNA-methode aan. Met behulp van 'site occupancy models' werd hierbij achteraf, in een heranalyse, de betrouwbaarheid verhoogd. Ook werd berekend hoeveel watermonsters nodig waren om een cumulatieve detectiekans van meer dan 95% te bereiken. Een simulatie liet zien dat eDNA onderzoekers die gebruik maken van deze modellen, op basis van veel minder monsters de aan- of afwezigheid van soorten betrouwbaar kunnen schatten.

6.3 ONDERZOEK NAAR KWANTIFICERING

Omdat de huidige KRW-maatlatten aantallen of biomassa's behoeven, is het gewenst om onderzoek te (blijven) doen naar de kwantificering via eDNA. Ook voor dit onderdeel kan het uitvoeren van theoretisch onderzoek met behulp van simulatiemodellen een effectief en inspirerend vertrekpunt zijn. Natuurlijk moeten we altijd in ons achterhoofd houden dat kwantificering voor een ecologische beoordeling wellicht niet noodzakelijk is; nieuwe analysemethoden kunnen nieuwe beoordelingsmethoden voortbrengen...

6.4 MODELONDERZOEK

De afscheiding van eDNA door een vis of een kikker is in feite een puntlozing. De verspreiding daarna kan beschreven worden met een eenvoudig dispersiemodel. Dispersie kan louter door diffusie veroorzaakt worden, maar ook door stroming. En de 'puntlozing' kan stil op een plek liggen, maar ook bewegen door de ruimte. De snelheid van de lozing, de flux, zal kunnen variëren, maar ook de snelheid waarmee het eDNA weer wordt afgebroken. Kortom, er is een beperkt aantal factoren, maar deze factoren kunnen wel sterk variëren. Wat is het relatieve effect van elk van deze factoren op de verspreiding van eDNA en welke terugkerende verspreidingspatronen zien wij ontstaan wanneer wij deze factoren realistisch invullen?

OPZET

Dit vraagstuk leent zich voor een simulatie-aanpak, waarbij deeltjes eDNA geproduceerd worden en ieder deeltje individueel gevolgd wordt (een simpele random-walk als simulatie van diffusie, optellen van stromingsvector voor stromende systemen). Natuurlijk heeft het deeltje ook een sterftekans, die bepaald wordt door de microbiële afbraaksnelheid. Het dier, als producent van deeltjes, moet zelf ook in het model gestopt worden, met zijn ruimtelijke en temporele gedrag. Omdat ook dat gedrag weer random variatie vertoont, moeten we een flink aantal herhalingen simuleren. Iedere simulatie genereert een ander ruimtelijk en temporeel patroon van concentraties (bijvoorbeeld berekend per vierkante meter wateroppervlak). Door deze te combineren met een reeks van bemonsteringsschema's, met verschillende frequenties in ruimte en tijd, kunnen we uiteindelijk uitrekenen wat de minimale frequenties of intervallen, moeten zijn om met een bepaalde kans één of meer deeltjes in je monster te vinden (H. Baveco persoonlijke mededeling).

De modelberekeningen zouden uitgevoerd moeten worden voor minimaal drie verschillende ruimtelijke settingen:

- 1) een klein, min of meer cirkelvormig water (poel, ven, vijver) met specifieke diameter;
- 2) een langgerekt lijnvormig water (sloot, vaart, beek) met specifieke breedte en stroomsnelheid;
- 3) een oever van een meer of plas (waar breedte geen rol speelt), met eventueel specifieke turbulentie, stroming, en dergelijke,

en voor verschillende soorten organismen, elk met een karakteristiek en onderscheidend ruimtelijk activiteitenpatroon.

FACTOREN

De hoeveelheid eDNA op een willekeurig punt in een water hangt in grote lijnen af van de volgende factoren:

- de flux, de uit- en afscheidingssnelheid van DNA door het organisme;
- de afbraaksnelheid van eDNA per tijdseenheid;
- het aantal exemplaren van het desbetreffende organisme;
- het verspreidingsgedrag van het desbetreffende organisme;
- de watertemperatuur;
- de waterbeweging (stroomsnelheid, turbulentie);
- de afstand van het punt tot de bron.

WAT WETEN WE VAN DEZE FACTOREN?

Flux

Takahara *et al.* (2012) stellen dat 1 milligram vis gemiddeld één detecteerbaar DNA molecuul oplevert. Gemiddeld..., maar wat is de range van verschillende soorten en met welke frequentie komt dat ene molecuul vrij.

Afbraaksnelheid van eDNA

Uit onderzoek is gebleken dat de houdbaarheid van vrij DNA in het water beperkt is. In de wetenschappelijke literatuur worden verschillende tijdspannen gemeld waarin het eDNA nog aantoonbaar aanwezig is. Hieruit leiden we af dat de levensduur van eDNA na uitscheiding varieert tussen één à twee weken (Thomsen *et al.* 2012b) en één maand (Dejean *et al.* 2011). In het geval van één maand vond het onderzoek plaats in een kunstmatig, bijna steriel milieu, dat ons inziens niet representatief is voor een natuurlijke situatie. Vooralsnog moeten we voor DNA in oppervlaktewater uitgaan van een houdbaarheidsperiode van niet meer dan een week. In een terrestrisch milieu blijft het langer aantoonbaar en ook lijken korte DNA-fragmenten relatief lang aanwezig te blijven (Dejean *et al.* 2011).

De korte houdbaarheid in oppervlaktewater betekent aan de ene kant dat men met eDNA een beeld krijgt van de recente aanwezigheid van de doelsoort(en). Aan de andere kant beperkt het de concentratie van eDNA in het water en de afstand waarover het eDNA zich na uitscheiding verspreidt.

Vermoedelijk kan het verdwijnen van eDNA beschreven worden door een exponentiële vervalfunctie, maar dit zou nader onderzocht moeten worden met behulp van qPCR. Onderzoek aan viraal DNA (complete virusdeeltjes) komt uit op een afbraaksnelheid van 70% per dag

(Minamoto *et al.* 2012a). Dat zou betekenen dat van initieel duizend deeltjes, er na zes dagen nog één à twee zouden resterende. Onbekend is natuurlijk of de resultaten aan viraal DNA rechtstreeks vertaald kunnen worden naar de afbraak van eDNA van vissen of amfibieën.

NADER ONDERZOEK

De gevonden verschillen in de afbraaksnelheid van eDNA kunnen het gevolg zijn van een aantal factoren. Een belangrijke factor is de beginconcentratie van het eDNA: hoe meer deeltjes bij aanvang, hoe langer er deeltjes gedetecteerd zouden kunnen worden. De hoeveelheid deeltjes bij aanvang kan beïnvloed worden door de opzet van het onderzoek. Bij experimenteel uitgezette vis kan de eDNA-flux en daarmee de concentratie eDNA in het water, als gevolg van stress de eerste dagen vele malen hoger zijn dan in een natuurlijk systeem (Takahara *et al.* 2012). Een andere factor is de aanwezige bacteriële gemeenschap in het water (Takahara *et al.* 2012) met, als derde, de invloed van de watertemperatuur op zijn functioneren.

Welke parameters het belangrijkst zijn voor de verspreiding van eDNA (flux, afbraaksnelheid, gedrag, populatiedichtheid), kan prima onderzocht worden met behulp van het eerder genoemde simulatiemodel. Voor een juiste schatting van de modelparameters kan het nodig zijn om aanvullende metingen te doen in het laboratorium. Hierbij gaat het vooral om het meten van fluxen en afbraaksnelheden van eDNA, voor meerdere soorten vissen en amfibieën en bij verschillende temperaturen.

Een simulatiemodel kan ons ook verder brengen in het onderzoek naar de mogelijkheden van kwantificering. Door de landschapsschaal in de analyse in te brengen en te kijken naar het effect van typische dichtheden (of extremen daarin). Hieruit moet duidelijk worden wat de perspectieven zijn voor het maken van dichtheidsschattingen op basis van ruimtelijke patronen in de hoeveelheid eDNA.

6.5 EXPERIMENTEEL VELDONDERZOEK

MODELTOETSING

In een experimenteel veldonderzoek kan men de modeluitkomsten toetsen. Men kan bijvoorbeeld soorten die niet in het systeem voorkomen, introduceren in enclosures. Vervolgens kan men onder verschillende omstandigheden de verspreiding van eDNA onderzoeken door middel van bemonsteringen en vergelijken met voorspellingen van het model.

PARALLELE BEMONSTERING

Een andere wijze om inzicht te krijgen in de mogelijkheden van de eDNA methode, is hem toe te passen parallel aan een 'klassieke' bemonstering. Tijdens een reguliere visbestandsopname neemt men watermonsters voor analyse van eDNA. De resultaten van deze analyse worden vervolgens vergeleken met de vangsten uit het reguliere onderzoek. De vraag die men hiermee kan beantwoorden, is of men met de eDNA methode dezelfde soorten aan kan tonen als met de klassieke bemonstering en welke bemonsteringsopzet hiervoor nodig is (hoeveel watermonsters en waar...).

6.6 OPTIMALISATIE VAN PRIJS/KWALITEIT-VERHOUDING

De prijs van een inventarisatie op basis van eDNA wordt bepaald door de kosten van bemonstering en analyse. Onder kwaliteit verstaan we in dit geval betrouwbaarheid.

De betrouwbaarheid van de eDNA-methode wordt ongetwijfeld bepaald door het aantal monsters en de verdeling van de monsters over het waterlichaam. De analysekosten zijn recht evenredig met het aantal monsters (quantumkorting daargelaten), maar dat geldt niet voor de bemonsteringskosten. Immers, deze omvatten een vast bedrag aan reiskosten naar de meetlocatie en eventueel voor de inzet van een boot.

Onderzoekers moeten vaststellen welke betrouwbaarheid bij welk doel gewenst is. De markt moet vaststellen welke prijs zij over heeft voor monitoringonderzoek. In het optimalisatieproces zullen beide bij elkaar gebracht moeten worden.

6.7 STANDAARDISATIE VAN BEMONSTERING EN ANALYSE

Een methode wordt bij voorkeur gestandaardiseerd door middel van een norm die de basis vormt voor een protocol. Norm en protocol waarborgen een kwalitatief verantwoorde uitvoering van het onderzoek en maken de resultaten vergelijkbaar met die van anderen.

Norm en protocol kunnen pas gestalte krijgen wanneer we voldoende inzicht hebben in het fenomeen detectiekans, de wijze waarop we deze kunnen beïnvloeden met onze bemonsteringsstrategie en de kosten die hieruit voortvloeien. In het protocol moet de optimale prijs/kwaliteitsverhouding zijn weerslag vinden.

Het ligt voor de hand te veronderstellen dat er verschillende protocollen komen voor de bemonstering van stagnant en stromend water, gezien het te verwachten verschil in het overheersende mechanisme achter de verspreiding van eDNA.

Een belangrijk aspect in het protocol voor de analyse van monsters is het voorkómen van contaminatie. Aan de ene kant door voorzorgsmaatregelen te nemen bij de voorbehandeling van monsters, aan de andere kant door het inbouwen van controlestappen. En uiteraard moeten ook de primers die ingezet worden, voldoen aan strenge voorwaarden.

6.8 VALIDATIE VAN PRIMERS

Cruciaal in de ontwikkeling van de eDNA methode is de ontwikkeling van soortspecifieke primers. Deze primers dienen dusdanig soortspecifiek te zijn, dat binding aan DNA van een andere soort dan de doelsoort uitgesloten kan worden. Kan dit niet, dan zal er altijd kans bestaan op een vals positief resultaat.

Om de gehele visgemeenschap te kunnen beschrijven middels eDNA dienen de DNA sequenties van alle voorkomende soorten (in het desbetreffende land of regio) bekend te zijn. Voor veel vissoorten, zo niet alle, zijn de DNA sequenties waaraan de soort te herkennen is, bekend. Dit is het geval voor alle in Nederland voorkomende vissoorten.

De methode dient echter voor elke nieuwe soort gevalideerd te worden. Het belangrijkste aspect hierin is dat het primerpaar ook werkelijk soortspecifiek is en niet bindt aan andere DNA fragmenten die eventueel in het watermonster kunnen zitten.

In de ontwikkeling van deze primers is het dus van belang om de soortspecificiteit goed te testen. Om de kwaliteit van de primers te waarborgen, is het zaak dat de primers volgens een standaardprotocol worden getest.

6.9 BEGROTING NADER ONDERZOEK

Om van de eDNA methode een volwaardige methode te maken is nog veel onderzoek nodig. Om op korte termijn meer inzicht te verschaffen in de (on)mogelijkheden van de eDNA methode, met betrekking tot vis, ligt naar ons idee de prioriteit bij het uitvoeren van onderzoek naar de optimale bemonsteringsstrategie (detectiekans) en de ontwikkeling van primers voor de in Nederland voorkomende vissoorten (en exoten). Voor dit onderzoek wordt hieronder een indicatie gegeven van de kosten.

ONDERZOEK OPTIMALE BEMONSTERINGSSTRATEGIE

Hierbij gaat het om onderzoek naar de verspreiding van eDNA in het milieu, om inzicht te krijgen in de detectiekans van eDNA onder uiteenlopende omstandigheden, en om in samenhang daarmee optimale bemonsteringsstrategieën te ontwikkelen die vastgelegd worden in protocollen. Het onderzoek omvat:

- 1) theoretisch onderzoek met behulp van een simulatiemodel;
- 2) experimenteel onderzoek aan modelparameters;
- 3) validatieonderzoek in het veld;
- 4) het opstellen van protocollen.

De onderdelen 1, 2 en 3 zijn vervlochten, onderdeel 4 is volgend. Bij de eerste drie onderdelen ligt de nadruk op het beschrijven van de realistische extremen (qua soorten en omstandigheden), niet direct op het beschrijven van de gemiddelde situatie of van scenario's voor alle soorten die gedetecteerd zouden moeten worden. Tabel 3 geeft een indicatieve begroting.

ONTWIKKELING PRIMERS

Bij het ontwikkelen van soortspecifieke primers dienen de hieronder toegelichte volgende vier stappen doorlopen te worden:

- 1) het ontwerpen van de primer;
- 2) het verkrijgen van een positieve controle;
- 3) het optimaliseren van de PCR reactie;
- 4) validatie van de primer in het veld.

Primer ontwerp

Sequenties van het marker-gen (bijvoorbeeld het mitochondriale gen Cytochrome B (CytB)) worden verkregen middels de Genbank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Binnen deze sequentie wordt gezocht naar single nucleotide polymorphisms (snp's), welke specifiek zijn voor de aan te tonen vissoort. Op basis van deze snp's worden primerparen ontworpen die deze snp's kunnen herkennen. De ontwikkelde primers worden vervolgens getest *in silico* door de primers via Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) te vergelijken in de Genbank. Primersequenties die met behulp van een BLAST als uniek naar voren komen worden geselecteerd voor het specifiek aantonen van vissoorten en worden vervolgens in het laboratorium getest. De primers worden chemisch gesynthetiseerd.

TABEL 3

INDICATIEVE BEGROTING ONDERZOEK BEMONSTERINGSSTRATEGIEËN

Omschrijving	Werkdagen	Kosten (Euro)
Theoretisch onderzoek		
Ontwikkelen simulatiemodel	10	10800
Simuleren diverse scenario's	15	16200
Evalueren en rapporteren	5	5400
		32400
Experimenteel onderzoek		
Bepalen modelparameters	120	72000
PCR-analyses		25000
		97000
Validatieonderzoek		
Veldonderzoek diverse scenario's	100	60000
PCR-analyses		25000
		85000
Opstellen protocollen		
Opstellen bemonsteringsprotocol(len)	10	8160

Positieve controle

De juiste omstandigheden voor de PCR reactie worden bepaald op basis van experimenten met een positieve controle. Deze positieve controle bestaat uit DNA van de aan te tonen vissoort. Dit DNA wordt bemachtigd door bijvoorbeeld een vinknip te nemen en hieruit het DNA te isoleren met behulp van een commerciële DNA isolatiekit. Door middel van PCR met de hierboven ontwikkelde specifieke primers op het geïsoleerde DNA wordt een PCR product verkregen welke vervolgens in een vector wordt geligeerd (bijvoorbeeld pGemT-easy, Promega). Deze vector met daarin het PCR product wordt vervolgens in de bacterie *Escherichia coli* gekloneerd (bijvoorbeeld stam DH5). Via een sequentie analyses uitgevoerd op dit gekloneerde DNA zal gekeken worden of dit DNA het verwachte product is. Bij een positief resultaat zal de *E.coli* stam met het gekloneerde DNA opgeslagen worden in een – 80 °C vriezer en kan in het verdere onderzoek gebruikt worden als een positieve controle voor de aan te tonen vissoort.

Optimaliseren PCR reactie

Door systematisch een groot aantal variabelen van de PCR condities aan te passen worden de optimale PCR condities voor een primercombinatie bepaald. De gevoeligheid en specificiteit van de PCR reactie met de betreffende primercombinatie wordt bepaald door de positieve controle te verdunnen en de ondergrens van de detectie te bepalen.

Veldtest

De selectiviteit van de ontwikkelde primers wordt vervolgens getest op watermonsters uit waterlichamen waarvan bekend is of deze de aan te tonen vissoort wel of niet bevatten. Verkregen PCR producten worden door middel van een sequentieanalyse gecontroleerd. Indien de sequentie van dit PCR product overeenkomt met die in de database, dan kan de primercombinatie waarmee dit PCR product is verkregen dienen als marker voor het detecteren van de aan te tonen vissoort in ecologisch onderzoek.

Ontwikkelingstijd en kosten

Per primer (vissoort) kan bovenstaand traject in circa 32 uur worden doorlopen wat de ontwikkelingskosten (inclusief verbruiksartikelen) op 2 640 Euro per soort brengt.

6.10 EEN OVERZICHT VAN MOGELIJKE PARTNERS IN HET ONDERZOEK

Veel onderzoek. Veel werk. Samenwerken op nationaal en internationaal niveau. Hieronder hebben we een aantal mogelijke partners in de verdere ontwikkeling genoemd. Het zijn instanties die momenteel in Nederland en België met eDNA werken, of vanuit hun ecologische expertise betrokken zijn. Maar ook instanties die momenteel niet op dit terrein actief zijn maar wel te maken hebben met monitoring, kunnen betrokken worden.

POTENTIËLE GEBRUIKERS IN NEDERLAND EN BELGIË

STOWA

Ministerie van I&M (Rijkswaterstaat)

Ministerie van Economische Zaken

Vlaamse Milieumaatschappij

Sportvisserij Nederland

Naturalis

PGO's

Natuurbeschermingsinstanties

Terreinbeheerders

Ecologische bureaus

ONDERZOEKINSTELLINGEN IN NEDERLAND EN BELGIË

KWR (Watercycle Research Institute)

Universiteiten

Alterra

Imares

Deltares

Nederlands Instituut voor Oecologisch Onderzoek (NIOO)

Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO), Brussel, België

6.11 EEN OVERZICHT VAN MOGELIJKE SUBSIDIEVERLENERS

STOWA

De STOWA financiert onderzoek ten dienste van het regionale waterbeheer (de waterschappen). Hierbij gaat het primair om de taken en verantwoordelijkheden ten aanzien van het waterkwaliteits- en waterkwantiteitsbeheer. Een criterium in ons geval is, of het onderzoek een goedkopere en/of betrouwbaarder wijze van monitoren kan opleveren, gericht op de beoordeling van de ecologische toestand volgens geaccepteerde of verplichte maatlaten.

WADDENFONDS

Het Waddenfonds is opgericht om een duurzame en kwalitatieve impuls te geven aan ecologie en economie van het Waddengebied. Sinds 1 januari 2012 zijn de provincies Noord-Holland, Groningen en Fryslân verantwoordelijk voor het Waddenfonds (bron: www.waddenfonds.nl).

NWO / STW

Projecten die in aanmerking komen voor financiering door NWO / STW

Open technologieprogramma (OTP) is het meest flexibele programma voor het indienen van een subsidieaanvraag zoals wij die voor ogen hebben. Het programma kent geen discipline grenzen en indieningstermijnen en de onderzoeksvoorstellen worden getoetst op wetenschappelijke kwaliteit en utiliteits perspectief. Doel van STW is het bijeen brengen van

wetenschappelijke onderzoekers en potentiële gebruikers. Maximale bijdrage STW 750.000. Indiener kan alleen iemand zijn met een vaste aanstelling als hoogleraar of UHD bij een Nederlandse universiteit / UMC. Casimir regeling mogelijk, dat wil zeggen dat een werknemer uit een bedrijf voor 50% gedetacheerd wordt bij een kennisinstelling. Deze 50% detachering kan worden begroot.

Voor vrijwel alle NWO / STW programma's geldt dat deze financiering bieden voor uitsluitend Nederlandse Universiteiten en in zeer beperkte mate ook voor kennisinstellingen. Dit traject kan alleen in worden gegaan als een universitaire groep de initiatiefnemer is en de leidersrol op zich neemt. De commerciële partijen kunnen maximaal een Casimir regeling uit STW aanvragen halen.

KP7

loopt ten einde en de meeste calls sluiten zeer binnenkort. De calls die er binnen afzienbare termijn aankomen zijn niet voor ons van toepassing.

KP8 (HORIZON 2020)

Horizon 2020 heeft drie centrale doelstellingen:

- uitstekend onderzoek: investeringen op het gebied van toponderzoek in Europa, waar onder een verhoging van het budget van de Europese Onderzoeksraad met 77 procent;
- concurrerende industrie: investeringen op het gebied van de ontwikkeling van nieuwe technologieën, betere toegang tot kapitaal voor ondernemers en ondersteuning van het midden- en kleinbedrijf;
- een betere samenleving: aandacht voor zaken als klimaatverandering, duurzaam transport en mobiliteit, duurzame energie, voedselveiligheid en -zekerheid, en vergrijzing van de Europese bevolking.

Eind 2013 gaan de eerste Horizon calls open. In de loop van de tijd zullen er ongetwijfeld interessante calls voor ons initiatief komen. Voorwaarde hierbij is echter wel dat de vraagstelling en daaruit voortkomende oplossing van hoogstaand wetenschappelijk niveau zijn.

EUROSTARS: SUBSIDIE INTERNATIONALE MARKTGERICHTE R&D (SUBSIDIE MAX. 50%)

Bedoeld voor een onderzoekuitvoerend MKB (research performing SME), die minstens 10% van de omzet of 10% van hun FTE's inzetten voor toegepast onderzoek en experimentele ontwikkeling. Daarnaast moet sprake zijn van een samenwerking tussen partijen uit minstens twee Eurostars-landen. Het doel van de subsidie is de time-to-market van deze nieuwe technologieën te verkorten en de technische risico's te verkleinen.

De hoogte van de subsidie is afhankelijk van de activiteiten in het project, de aard van de deelnemers en het land waarin zij zijn gevestigd. In Nederland bedraagt de subsidie maximaal 50% van de kosten van de Nederlandse deelnemers.

De deadline voor de laatste call was 4 April 2013, 20:00 uur.

INNOVATIEFONDS (KREDIET)

Met het nieuwe innovatiefonds kunnen bedrijven hun ideeën toch uitvoeren. De focus ligt op de fase waarin kennis wordt omgezet in een eindproduct (van kennis naar kassa).

De regeling is verbreed naar het MKB plus: bedrijven met meer dan 250 medewerkers.

Deze regeling loopt van 1 januari 2012 tot 2015.

7

LITERATUUR

- Blanchet, S. 2012. The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. *Fisheries Management and Ecology* 19: 120-132.
- Calvignac-Spencer, S., K. Merkel, N. Kutzner, H. Kühl, C. Boesch, P.M. Kappeler, S. Metzger, G. Schubert & F.H. Leendertz. 2013. Carrion fly-derived DNA as a tool for comprehensive and cost-effective assessment of mammalian biodiversity. *Molecular Ecology* 22: 915-924.
- Darling, J.A. & A.R. Mahon. 2011. From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research* 111: 978-988.
- Dejean, T., A. Valentini, A. Duparc, S. Pellier-Cuit, F. Pompanon, P. Taberlet & C. Miaud. 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems, *PLoS ONE* 6(8): e23398. doi:10.1371/journal.pone.0023398.
- 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.
- EC 2000. Richtlijn 2000/60/EG van het Europees Parlement en de Raad van 23 oktober 2000 tot vaststelling van een kader voor communautaire maatregelen betreffende het waterbeleid. *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen* L 327.
- ECALS. 2013. *Environmental DNA calibration study interim technical review report, February 2013*. U.S. Army Corps of Engineers ERDC Environmental Laboratory / U.S. Army Corps of Engineers Great Lakes and Ohio Rivers Division / U.S. Geological Survey / U.S. Fish and Wildlife Service.
- Ficetola, G.F., C. Miaud, F. Pompanon, & P. Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples, *Biology Letters* 4: 423-425.
- Foot, A.D., P.F. Thomsen, S. Sveegaard, M. Wahlberg, J. Kielgast, L.A. Kyhn, A.B. Salling, A. Galatius, L. Orlando & M.T.P. Gilbert. 2012. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS ONE* 7(8): e41781. doi:10.1371/journal.pone.0041781.
- Goldberg, C.S., D.S. Pilliod, R.S. Arkle & L.P. Waits. 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain Tailed frogs and Idaho Giant salamanders. *PLoS ONE* 6(7): e22746. doi:10.1371/journal.pone.0022746.
- Goldberg, C.S., A. Sepulveda, A. Ray, J. Baumgardt & L.P. Waits. 2013. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science* 32: 792-800.

- Haile, J., R. Holdaway, K. Oliver, M. Bunce, M.T.P. Gilbert, R. Nielsen, K. Munch, S.Y.W. Ho, B. Shapiro & E. Willerslev. 2007. Ancient DNA chronology within sediment deposits: are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Molecular Biology and Evolution* 24: 982-989.
- Herder, J. 2011. *Pilot environmental DNA Grote modderkruiper*. Rapport 2011-102. Stichting RAVON, Nijmegen.
- Herder, J.E., A. Valentini & J. Kranenbarg. 2012. Detectie van Grote modderkruipers met behulp van environmental DNA. *H₂O* 45(3): 25-27.
- Herder, J., J. van Delft, E. Bellemain & A. Valentini. 2013. Environmental DNA, krachtig gereedschap voor het monitoren van fauna. *De Levende Natuur* 114: 108-113.
- Hofreiter, M., J.I. Mead, P. Martin & H.N. Poinar. 2003. Molecular caving. *Current Biology*. 13: R693-R695.
- 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.
- Jerde, C.L., L. Chadderton, A.R. Mahon, M.A. Renshaw, J. Corush, M.L. Budny, S. Mysorekar & D.M. Lodge. 2013. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70: 522-526.
- Lance, R.F. & M.R. Carr. 2012. *Detecting eDNA of invasive dreissenid mussels: report on Capital Investment Project*. ANSRP Technical Notes Collection. ERDC/TN ANSRP-12-2. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS, USA.
- Lodge, D.M., C.R. Turner, C.L. Jerde, M.A. Barnes, L. Chadderton, S.P. Egan, J.L. Feder, A.R. Mahon & M.E. Pfrender. 2012. Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2555-2558.
- Lydolph, M.C., J. Jacobsen, P. Arctander, M.T.P. Gilbert, D.A. Gilichinsky, A.J. Hansen, E. Willerslev & L. Lange. 2005. Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1012-1017.
- Mahon, A.R., M.A. Barnes, F. Li, S.P. Egan, C.E. Tanner, S.T. Ruggiero, J.L. Feder, & D.M. Lodge. 2013a. DNA-based species detection capabilities using laser transmission spectroscopy. *Journal of the Royal Society Interface* 10(78): 20120637.
- Mahon, A.R., C.L. Jerde, M. Galaska, J.L. Bergner, W.L. Chadderton, D.M. Lodge, M.E. Hunter & L.G. Nico. 2013b. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLoS ONE* 8(3): e58316. doi:10.1371/journal.pone.0058316.
- Minamoto, T., M.N. Honjo, H. Yamanaka, K. Uchii & Z. Kawabata. 2012a, Nationwide cyprinid herpes virus contamination in natural rivers of Japan. *Research in Veterinary Science* 93: 508-514.
- Minamoto, T., H. Yamanaka, T. Takahara, M.N. Honjo, & Z. Kawabata. 2012b. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13: 193-197.
- Molen, van der, D.T., R. Pot, C.H.M. Evers & L.L.J. van Nieuwerburgh (red). 2012. *Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn Water 2015-2021*. Rapport 2012-31. Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Amersfoort.
- Nichols, R.V., H. Konigsson, K. Danell & G. Spong. 2012. Browsed twig environmental DNA: diagnostic PCR to identify ungulate species. *Molecular Ecology Resources* 12: 983-989.

- NFI. 2006. *De essenties van forensisch DNA-onderzoek*. Nederlands Forensisch Instituut, Den Haag.
- Ogram, A., G.S. Sayler & T. Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7: 57-66.
- Olson, Z.H., J.T. Briggler & R.N. Williams. 2012. An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research* 39: 629-636.
- Schmidt, B.R., M. Kéry, S. Ursenbacher, O.J. Hyman & J.P. Collins. 2013. Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: a case study of an emerging amphibian pathogen. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 646-653.
- Takahara, T., T. Minamoto & H. Doi. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE* 8(2): e56584. doi:10.1371/journal.pone.0056584.
- Takahara, T., T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi & Z. Kawabata. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE* 7(4): e35868. doi:10.1371/journal.pone.0035868.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, P.R. Møller, M. Rasmussen & E. Willerslev. 2012a. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7(8): e41732. doi:10.1371/journal.pone.0041732.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, T.P. Gilbert, L. Orlando & E. Willerslev. 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565-2573.
- Valentini, A., C. Miquel & P. Taberlet. 2010. DNA barcoding for honey biodiversity. *Diversity* 2: 610-617.
- Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson & W. Nelson. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- Wanink, J.H., J. Warmink & G. Wolters. 2013. *Onderzoek zwemmersjeuk recreatieplas Het Lageveld: Analyse watermonsters, voor en achter een cercariënbarrière, met behulp van de eDNA-methode*. Rapport 2013-056. Koeman en Bijkerk bv, Haren.
- Warmink, J.A. & J.D. van Elsas. 2008. Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? *The ISME Journal* 2(8): 887-900.
- Wilcox, T.M., K.S. McKelvey, M.K. Young, S.F. Jane, W.H. Lowe, A.R. Whiteley & M.K. Schwartz. 2013. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS ONE* 8(3): e59520. doi:10.1371/journal.pone.0059520.
- Willerslev, E., A.J. Hansen, J. Binladen, T.B. Brand, M.T.P. Gilbert, B. Shapiro, M. Bunce, C. Wiuf, D.A. Gilichinsky, & A. Cooper. 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments, *Science* 300: 791-795.
- Wilson, C. & E. Wright. 2013. *Using environment DNA (eDNA) as a tool in risk-based decision-making*. Aquatic Research Series 2013-01. Aquatic Research and Development Section, Ontario Ministry of Natural Resources, Peterborough, Ontario, Canada.
- Yu, D.W., Y.Q. Ji, B.C. Emerson, X.Y. Wang, C.X. Ye, C.Y. Yang, & Z.L. Ding. 2012. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 613-623.

WEBSITES

CBOL	http://www.barcoding.si.edu/
DDBJ	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
ENA	http://www.ebi.ac.uk/ena/
Genbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Koeman en Bijkerk bv	www.koemanenbijkerk.nl
KWR Watercycle Res Inst	www.kwrwater.nl
RAVON	www.environmental-dna.nl
Spygen	www.spygen.fr
STOWA	www.stowa.nl
Sylphium Life Sciences	www.sylphium.com

