

DNA heeft de toekomst

Environmental DNA alternatief voor KRW-visstandbemonstering?

TEKST Jelger Herder, Jan Kranenborg RAVON
 Marco Beers, Waterschap Brabantse Delta
 Lenke Bogerd, Waterschap Vallei en Veluwe
 Bas van der Wal, STOWA

FOTOGRAFIE Jelger Herder, RAVON en Sportvisserij Nederland

Met de eDNA-methode worden soorten aangetoond door middel van DNA-sporen in het water. De laatste jaren is de methode succesvol ingezet bij soortspecifiek onderzoek. In 2013 is er in Nederland een nieuwe innovatieve methode getest waarbij niet één vissoort, maar alle vissoorten gelijktijdig in kaart worden gebracht. Deze methode lijkt goed bruikbaar voor toepassingen in het waterbeheer.

Door de waterbeheerders wordt periodiek de visstand bemonsterd. Dit om een beeld te krijgen van het ecologisch functioneren van watersystemen en te voldoen aan de KRW-rapportageverplichting. De huidige methode van bemonsteren kent een aantal nadelen. Bij het inventariseren van specifieke vissoorten is een nieuwe monitoringstechniek, waarbij sporen van DNA (eDNA) in het water worden geanalyseerd, inmiddels succesvol beproefd. De methode biedt grote mogelijkheden voor waterbeheerders in de toepassing bij de monitoring van waterorganismen.

Groot succes

Soorten die in het water leven laten daarin, via huidcellen,

faeces en urine, DNA achter. Dit environmental DNA (eDNA) kan in een watermonster worden verzameld waarna in het laboratorium kan worden getest of DNA van een bepaalde soort in het monster zit. Hierbij wordt het DNA uit het watermonster geëxtraheerd. Vervolgens worden van de vissoort waarin men geïnteresseerd is unieke, soortspecifieke aan DNA-verwante fragmenten toegevoegd, de zogenoemde 'primers'. Tijdens de daarop volgende zogenaamde 'PCR-analyse' worden alleen die stukjes DNA vermeerderd waarmee een overeenkomst bestaat met de toegevoegde soortspecifieke primers. Wanneer er inderdaad DNA wordt vermeerderd (een 'positieve PCR'), wordt inzicht verkregen in het voorkomen van de vissoort in het water waaruit het monster genomen is. Onderzoek heeft laten zien dat eDNA in het water binnen enkele





De trefkans met eDNA blijkt voor wat betreft de grote modderkruiper drie keer hoger dan met het elektrovisseren.

weken afbreekt, het aantonen van eDNA van een soort wijst dus op recente aanwezigheid van die soort.

Grote modderkruiper

Sinds de eerste toepassing van deze methode in 2011 voor het detecteren van grote modderkruipers, is het snel gegaan; alleen het voorkomen van de grote modderkruiper werd sindsdien al op ruim zevenhonderd locaties succesvol onderzocht. Hier-

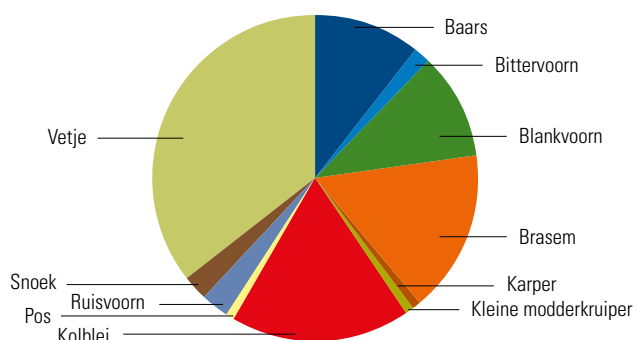
door is de kennis over de verspreiding van deze soort enorm toege-

eDNA-metabarcoding leent zich voor het aantonen van alle in Nederland voorkomende vissoorten

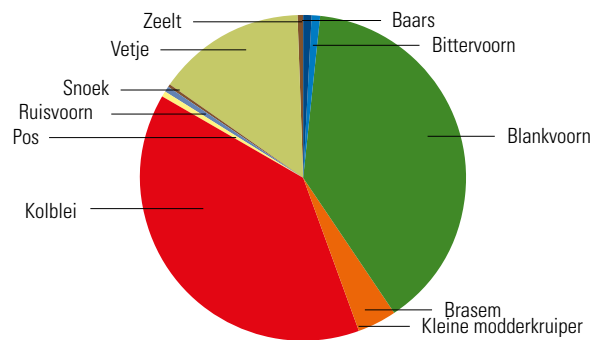
nomen. Door de veel grotere effectiviteit van de methode kunnen

tegen relatief lage kosten veel plekken onderzocht worden. Bij een grootschalig verspreidingsonderzoek in het beheergebied van Waterschap Rivierenland bleek de trefkans met de eDNA-methode ongeveer drie keer hoger dan de trefkans met elektrovisseren. Ook soortspecifiek eDNA-onderzoek naar amfibiesoorten als kamsalamander en knoflookpad blijkt bijzonder succesvol. Zo werden om de methode te valideren 140 locaties onderzocht ➤

Dijkwetering eDNA



Dijkwetering electro





Grote soorten als karpers en brasems worden relatief vaak gemist met de elektrovisbemonstering doordat grote individuen goed in staat zijn te vluchten.

waarvan bekend was dat de kamsalamander aanwezig was en 30 locaties waar de soort niet aanwezig was. Op 139 locaties van de 140 locaties (99,3 %) werd de soort met eDNA succesvol aangetoond terwijl alle 30 controlelocaties negatief scoorden. Voor de vroegtijdige signalering van invasieve exotische vissoorten blijkt de methode ook goed te werken. Verder biedt de methode voor waterbeheerders ook mogelijkheden voor het in kaart brengen van andere waterorganismen zoals blauwalgen, kiezelwieren en macrofauna.

Metabarcoding: inzicht in alle vissoorten

Met de hierboven beschreven soortspecifieke methode is het mogelijk om één tot hooguit enkele soorten gelijktijdig in een watermonster te detecteren. De methode is niet erg geschikt om informatie te verkrijgen over een groot aantal soorten, zoals bijvoorbeeld gewent is voor de ecologische beoordeling voor de Kaderrichtlijn Water (KRW). Dit komt doordat er slechts enkele soorten gelijktijdig kunnen worden geanalyseerd in één analysegang. Dit maakt dat voor het gelijktijdig detecteren van een groot aantal soorten veel analyses nodig zijn en

het praktische problemen oplevert bij soorten die in lage dichtheden voorkomen.

Daarom is voor het vaststellen van een groot aantal soorten de 'metabarcoding' methode ontwikkeld. Bij deze methode wordt al het eDNA in een watermonster van bijvoorbeeld de soortgroep vissen vermeerderd met behulp van een universele primer voor vissen. De sequenties (DNA-codes) van het vermeerderde DNA worden vervolgens uitgelezen met een zogenaamde Next Generation Sequencer (NGS). De gevonden sequenties worden tot slot gematcht in een referentiedatabase met informatie van alle bekende vissoorten, waardoor een soortenlijst wordt verkregen.

Pilot eDNA-metabarcoding

In 2013 hebben RAVON, STOWA en vier waterschappen (De Dommel, Vallei en Veluwe, Rijn en IJssel en Brabantse Delta) een pilot uitgevoerd waarbij de uitkomsten van eDNA-metabarcoding vergeleken zijn met visstandbemonsteringen voor de Kaderrichtlijn Water (KRW). Het doel hiervan was om te kijken of er met eDNA-metabarcoding in een water dezelfde vissoorten worden gevonden als met de KRW-visstandbemonstering. Hierbij is

ook gekeken naar de hoeveelheid aangetroffen eDNA van soorten in relatie tot het aantal gevangen individuen van deze soorten in de KRW-visstandbemonstering. Onderstaan wordt ingegaan op de resultaten behaald in stilstaande wateren.

Kwantificering aandeel soorten

Met behulp van eDNA-metabarcoding is het mogelijk de hoeveelheid DNA per soort in het monster te bepalen. Bij vergelijking van het percentage eDNA per soort met het aandeelpercentage van de soort in de KRW-visstandbemonstering van de vier onderzochte wateren, komt naar voren dat soorten die het meest gevangen worden veelal ook een groot volumeaandeel hebben in eDNA. Een goed voorbeeld is een onderzoek in de Dijkwetering, waar met beide methoden elf soorten zijn aangetroffen, weergegeven. Vetje, kolblei, brasem en blankvoorn behoren bij zowel de KRW-visstandbemonstering als met eDNA-metabarcoding tot de soorten met een hoog relatief aandeel. Baars heeft bij eDNA een hoog aandeel maar niet in de KRW-visstandbemonstering. De gevonden resultaten geven een indicatie dat eDNA-metabarcoding in potentie bruikbaar is voor het kwantificeren van het aantelsaandeel van verschillende soorten binnen de visstand.

Toekomst

De resultaten uit de pilotstudie laten zien dat het met de eDNA-metabarcoding-methode zeer goed mogelijk is om in stilstaande wateren de soortsaamenstelling in een KRW-bemonsteringstraject te bepalen. De methode leent zich voor het aantonen van alle in Nederland voorkomende vissoorten (binnen de pilot werden reeds 26 vissoorten met eDNA aangetoond). Vergelijking van de hoeveelheid eDNA van soorten in de watermonsters met het aantal aangetroffen individuen van de soorten in de KRW-visstandbemonstering binnen een monstertraject, laat zien dat er tevens potentie is voor de kwantificering van dichtheden van soorten in de visstand. Het experimenteel testen en valideren van de eDNA-metabarcoding-

methode, bijvoorbeeld in vijvers met een bekende soortensamenstelling, aantallen en biomassa per soort, kan hier meer inzicht in geven. Mocht dit positief verlopen dan kan eDNA-metabarcoding gebruikt worden voor het doen van kwantitatieve visstandsopnamen, zoals voor de Kaderrichtlijn Water. De huidige KRW-maatlatten zijn echter ontwikkeld en afgestemd op de traditionele visstandbemonsteringen met vangtuigen, elektrovisapparaat, zegen en kuil. Bij een eventuele keuze voor eDNA als inventarisatiemethode zal er dan een aanpassing van de vismaatlatten moeten plaatsvinden. Hieraan voorafgaand dienen de zwakke en sterke punten van zowel de eDNA-methode als de gangbare bemonsteringsmethoden worden beschouwd voor het accuraat in beeld brengen van de visstand. De referentie daarbij is de werkelijke visstand en het inzicht dat deze geeft in de ecologische kwaliteit van het water, en dus niet noodzakelijkerwijs de uitkomst van de traditionele bemonstering, omdat ook deze methode beperkingen heeft. Naast stilstaande wateren werden in de pilot ook stromende wateren met eDNA bemonsterd. De gehanteerde monstermethode (stroomafwaarts van het traject bemonsteren) bleek achteraf niet geschikt om het hele traject representatief te bemonsteren. Door de zeer beperkte stroming was er voor deze methode op de meeste locaties namelijk onvoldoende menging van het water. Onderzoek in Frankrijk duidt erop dat er met een aangepaste eDNA-monstermethode in stromende wateren vergelijkbare resultaten behaald worden als in onderhavig artikel beschreven voor stilstaande wateren. Voor de stromende wateren in Nederland moeten de bemonsteringsmethode en het bemonsteringsprotocol goed afgestemd worden op de eigenschappen en vooral op de mate van stroming van de te onderzoeken wateren.

V

Kijk voor de geraadpleegde literatuur op www.invisionair

Onderzoekopzet en methoden

Het onderzoek in stilstaande wateren is uitgevoerd op vier locaties, te weten de Dijkwetering bij Eemnes, de Lummerwetering nabij Elburg en de Terwoldse Wetering en Nieuwe Wetering in het IJsseldal. Het eDNA-monster is verzameld door, verspreid over het KRW-bemonsteringstraject, met een monsterschepje 90 ml water te verzamelen. Direct na het verzamelen is het water geconserveerd in een buffer op basis van alcohol om DNA-afbraak te voorkomen. De monsters zijn geanalyseerd door SPYGEN, het laboratorium waarmee RAVON samenwerkt. De KRW-visstandbemonsteringen zijn met behulp van een elektrovisapparaat binnen enkele dagen na het nemen van de eDNA-watermonsters uitgevoerd door onafhankelijke bureaus.

Aangetroffen soorten

Met de eDNA-metabarcoding werd een vollediger beeld van de soortensamenstelling verkregen dan met de gangbare KRW-visstandbemonstering. Met de metabarcoding-methode werden er in twee van de vier wateren evenveel soorten aangetroffen en in de andere twee wateren 4 tot 5 soorten meer dan met de KRW-visstandbemonsteringen. Op alle vier locaties leverde een combinatie van beide methoden meer soorten op dan de methodes op zich. Vier keer werd een soort in een water gemist met de eDNA-metabarcoding methode. In alle gevallen ging het om soorten die in lage dichtheden aanwezig waren in de KRW-visstandbemonstering (maximaal zeven individuen per soort gevangen) en veelal kleinere soorten zoals bierpje, riviergrondel en vetje of kleinere individuen zoals van zeelt. Bij de KRW-visstandbemonstering viel het op dat karper (twee van de twee locaties) en brasem (twee van de vier locaties) relatief vaak werden gemist. Dit zou kunnen worden verklaard doordat volwassen individuen van deze soorten beter in staat zijn weg te vluchten tijdens elektrovisbemonsteringen en daardoor gemist kunnen worden.

