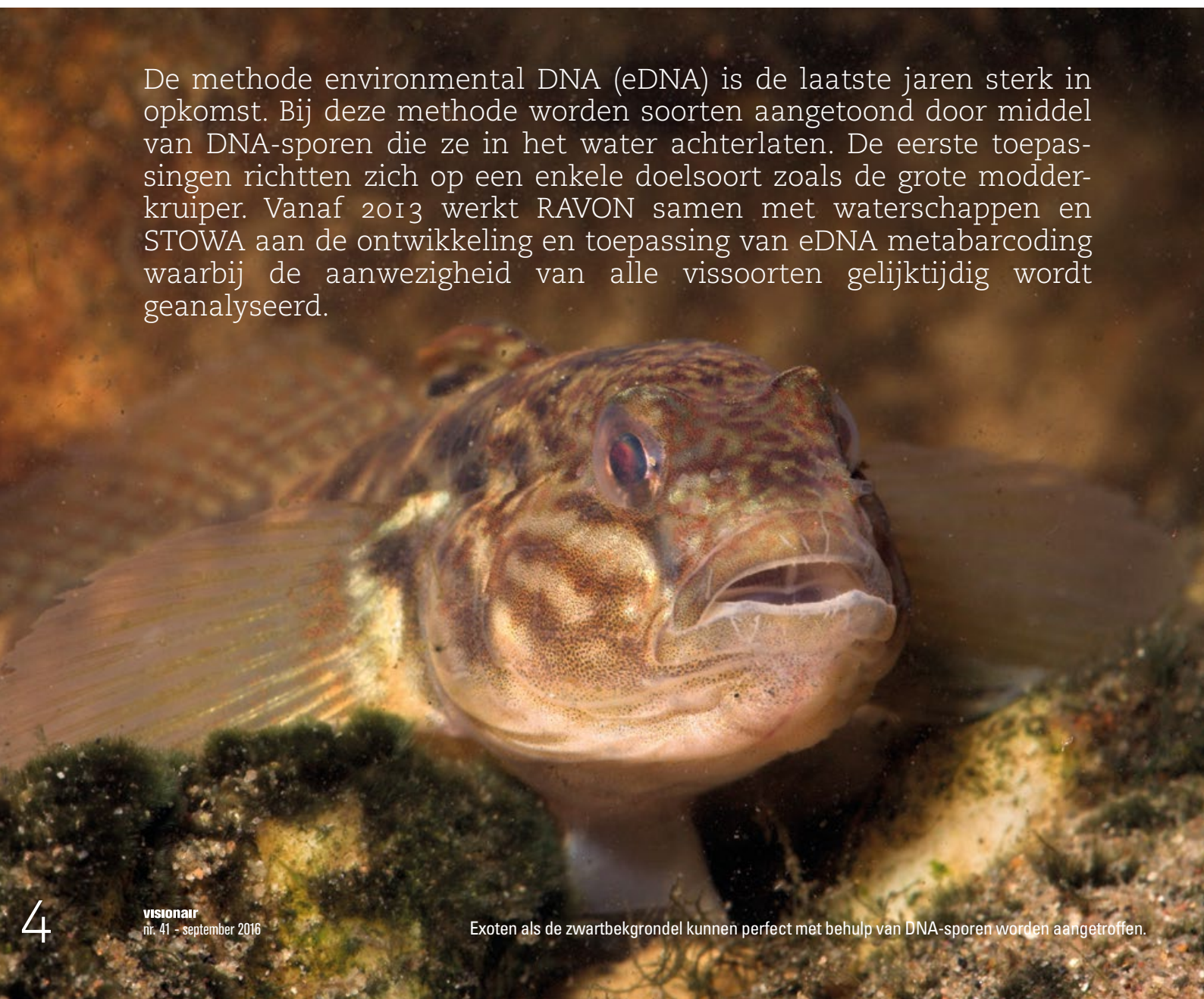


Tot op het molecuul

Revolutionaire bemonsteringsmethode blijkt breed inzetbaar

TEKST Jelger Herder en Jan Kranenbarg, RAVON, Marco Beers, Waterschap Brabantse Delta, Matthijs de Vos, Waterschap Rijn & IJssel, Bas van der Wal, STOWA
FOTOGRAFIE Jelger Herder

De methode environmental DNA (eDNA) is de laatste jaren sterk in opkomst. Bij deze methode worden soorten aangetoond door middel van DNA-sporen die ze in het water achterlaten. De eerste toepassingen richtten zich op een enkele doelsoort zoals de grote modderkruiper. Vanaf 2013 werkt RAVON samen met waterschappen en STOWA aan de ontwikkeling en toepassing van eDNA metabarcoding waarbij de aanwezigheid van alle vissoorten gelijktijdig wordt geanalyseerd.



Om een beeld te krijgen van het ecologisch functioneren van watersystemen en te voldoen aan de KRW-rapportageverplichtingen, inventariseren waterbeheerders periodiek de visstand in hun waterlichamen volgens de methode van het Handboek Hydrobiologie (STOWA, 2010). Hierbij worden de verschillende habitats bemonsterd met vangtuigen zoals de zegen, elektrovisserij en kuil. In 2013 is een eerste pilot uitgevoerd waarbij de uitkomsten van eDNA-metabarcoding werden vergeleken met de vangsten van KRW-visstandbemonsteringen. De uitkomsten hiervan waren veelbelovend en daarom is in 2015 door RAVON een vervolgpilot uitgevoerd samen met de STOWA en elf waterschappen.

Monsterlocaties

Binnen het onderzoek is een groot deel van de in Nederland voorkomende watertypen onderzocht. Op 55 locaties, verdeeld over 12 KRW-watertypen, werden eDNA-watermonsters genomen en vergeleken met de uitkomsten van de KRW-visbemonstering. Onder de bemonsterde watertypen bevonden zich stromende wateren (variërend van kleine bovenloopjes tot bredere, traag stromende riviertjes), lijnvormige stagnante wateren (variërend van poldervaarten tot grote kanalen) en overige stilstaande wateren (variërend van petgaten en ondiepe laagveenplassen tot grote zandwinplassen). Hiernaast is ook een aantal brakke wateren onderzocht waaronder de Noorder IJplas in Noord-Holland en enkele wateren in Zeeland.

Methode

De eDNA-watermonsters zijn genomen op de locaties van KRW-visbemonsteringen, waarbij in de regel een traject van 250 meter werd bemonsterd. De eDNA-monsters zijn zo kort mogelijk voorafgaand aan de KRW-visbemonsteringen genomen. De KRW-visbemonsteringen werden uitgevoerd door adviesbureaus of door het waterschap zelf waarbij doorgaans elektrisch vissen of zegen werden toegepast en in de helft van de gevallen een combinatie van beide. De eDNA-monsters zijn verzameld met speciaal voor eDNA ontwikkelde VigiDNA-filters. Hierbij is water verzameld over het hele traject van 250 meter door schepjes water in een zak te deponeren of met een pomp. Met de pomp werd het water direct door het filter gepompt. Het water uit de zak is aan het einde van het traject gemengd en vervolgens gefiltreerd. Voor de analyse is het DNA-materiaal gebruikt dat op het filter achterblijft.

Veel soorten

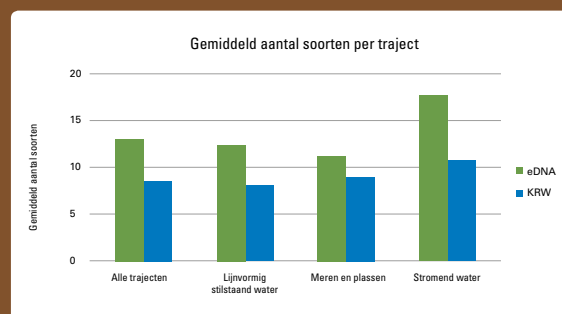
Het aantal aangetroffen soorten met eDNA bleek op vrijwel alle onderzochte locaties hoger dan het aantal soorten dat werd aangetroffen met de KRW-visbemonstering op hetzelfde traject. Met eDNA werden er gemiddeld 1,6 keer meer soorten gedetecteerd. In stromende wateren was het verschil het grootst met 1,8 keer meer soorten, in meren en plassen het laagst met 1,3 keer meer soorten. Bij stromende wateren moet er rekening worden gehouden dat een deel van het gedetecteerde eDNA bovenstrooms van het traject afkomstig kan zijn: buitenlandse studies laten zien dat eDNA in ►

eDNA metabarcoding analyse

De eDNA-analyses zijn uitgevoerd door het Franse onderzoekslaboratorium SPYGEN. Voor de analyses is gebruik gemaakt van universele primers voor vissen die zich richten op een kort fragment op het 12S-gen. Dit is van belang omdat eDNA snel afbreekt in het water en 95% van de aanwezige fragmenten korter dan 150 baseparen zijn. De primers vermeederen eDNA van alle vissoorten en rondbekken (zee,- rivier- en beekprik) waarbij unieke DNA-sequenties voor de verschillende vissoorten gebruikt worden. Weinig andere soorten worden vermeerderd. Dit is belangrijk omdat bij de vermenigvuldiging van het DNA in een monster, het DNA van soorten met veel DNA-fragmenten de resultaten van zeldzamere soorten met minder DNA-fragmenten anders kan gaan overschaduwen, waardoor deze niet worden opgemerkt.

Om soorten die in lage dichtheden voorkomen te kunnen detecteren zijn per monster 12 afzonderlijke zogenaamde Polymerase Chain Reaction (PCRs) gedraaid, aangevuld met negatieve controles om vast te stellen dat er geen valse positieven zijn. Ook is gecheckt of de hoeveelheid DNA overeen kwam met de verwachte hoeveelheid (positieve controle). Daarna zijn van alle fragmenten de DNA-sequenties uitgelezen met behulp van Next Generation Sequencing. Vervolgens zijn eventuele PCR en sequencing fouten er met speciale software uitgefilterd en de gevonden DNA-sequenties gematched aan een referentiedatabase waarbij iedere sequentie aan de juiste soort wordt toegewezen. De uitkomst is een betrouwbaar databestand met daarin per soort het aantal gevonden sequenties (DNA-fragmenten).

Het gemiddeld aantal aangetroffen soorten per traject met eDNA en bij de KRW-visbemonstering. Gegeven zijn alle trajecten samen (n=63) en opgesplitst naar lijnvormig stilstaand water (n=32), meren en plassen (n=18) en stromend water (n=13).



snelstromend water enkele kilometers stroomafwaarts van de bron gedetecteerd kan worden. De concentraties eDNA nemen wel sterk af verder weg van de bron. Dit verklaart het hogere aantal soorten echter slechts voor een klein deel, in stilstaande lijnvormige wateren waar waterverplaatsing geen rol speelt, werden namelijk ook 1,6 keer meer soorten aangetroffen.

Trefkans per soort

Om de trefkans per soort te bepalen is gekeken op welk percentage van de trajecten waar een soort voorkwam, de soort is aangetroffen met een methode (eDNA of KRW-visbemonstering).

Om een voldoende grote steekproef per soort te krijgen zijn enkel soorten die op meer dan 7 trajecten voorkwamen meegenomen. De trefkans met eDNA lag voor alle 25 soorten boven de 75 procent en veelal boven de 90 procent. Bij de KRW-bemonstering gold dit op trajectniveau maar voor vier soorten (baars, blankvoorn, riviergrondel en snoek). Figuur 2 laat zien dat de trefkans met eDNA, hoger is dan die met traditionele bemonsteringsmethoden. In een beperkt aantal gevallen werden soorten met eDNA gemist, het ging daarbij hoofdzakelijk om soorten die in zeer lage dichtheden (minder dan 10 individuen) op het traject waren aangetroffen in de KRW-visbemonstering. Tot slot zijn enkele soorten zoals kroeskarper en gibel op het in dit onderzoek vermeerderde eDNA fragment niet van elkaar te onderscheiden. Dit kan in de toekomst onderzocht worden door het toevoegen van primers die zich op een 2e fragment richten waarop wel onderscheid te maken is.

Tilapia in de grachten van Den Haag

Uit de eDNA-analyses kwamen ook enkele opvallende detecties naar voren. Zo werd er in de grachten van Den Haag eDNA van cichliden (waartoe de tilapia behoort) gedetecteerd. In het Twiske werd horsmakreel aangetroffen en in de Zeegerplas Europese sardine. Laatst genoemde soorten worden als aasvis gebruikt voor het vissen op roofvis en dat vormt mogelijk de bron voor het aangetroffen DNA. Het eDNA van cichliden kan afkomstig zijn van consumptieresten van tilapia of van uitgezette aquariumvissen. Het detecteren van deze soorten illustreert hoe goed de eDNA-methode in staat is om zeer lage hoeveelheden DNA te traceren. Bij de detecties ging het bijna altijd om minimale hoeveelheden eDNA wat mogelijkheden biedt om dergelijke waarnemingen makkelijk uit de soortenlijsten te filteren.

De trefkans voor bittervoorn lag met eDNA-methode ruim twee keer hoger dan die in de KRW-bevissing.

Hoge reproduceerbaarheid

In het onderzoek is ook gekeken naar de reproduceerbaarheid van de eDNA-methode. Zo is een monster uit de Essche Stroom in duplo geanalyseerd. De twee analyses gaven nagenoeg dezelfde uitkomst qua soorten (21 soorten gelijk) en verhoudingen tussen de soorten ($R^2 = 0,979$). Op vier locaties zijn meerdere monsters in het veld verzameld. Drie onafhankelijk van elkaar verzamelde monsters in de Noorder IJplas gaven ook nagenoeg een gelijk beeld ($R^2 > 0,9$). In het geval van de Deelen werd de slechtste correlatie gevonden. Hier gaven twee van de drie onafhankelijk verzamelde monsters een redelijk vergelijkbaar beeld ($R^2 = 0,6$) maar week het derde af doordat daar een veel groter aandeel blankvoorn in zat. Mogelijk is dit veroorzaakt doordat bij het derde monster net in de buurt van een school blankvoorns water is verzameld of dat er een stuk weefsel van de blankvoorn op het filter is gekomen. De hoge reproduceerbaarheid van de analyse en monsternamen bieden perspectief voor het verkrijgen van betrouwbare, semi-kwantitatieve, informatie over de aanwezige visstand.

Vervolgonderzoek

eDNA-metabarcoding blijkt een betrouwbare, effectieve en bovendien diervriendelijke en weinig versturende methode voor het in kaart brengen van de aanwezige vissoorten. De methode is inzetbaar voor het in beeld brengen van de soortenrijkdom maar ook voor vraagstukken met betrekking tot het voorkomen van bedreigde of exotische soorten of op het gebied van vismigratie (zijn soorten reeds voorbij een bepaalde barrière?). Daarnaast lijkt de methode in potentie geschikt voor het bepalen van semi-kwantitatieve visgemeenschapsindicatoren. Dit biedt in de toekomst mogelijkheden voor toepassing in KRW-vismaatlaten. Met de in dit onderzoek gehanteerde opzet bleek het niet goed mogelijk om de eDNA-verhoudingen binnen een traject te vergelijken met de hier aangetroffen aantallen en biomassa in de KRW-visbemonsteringen. Bij een studie in België (INBO in samenwerking met SPYGEN) met behulp van proefvijvers waarbij de exacte biomassa en aantallen per soort bekend was, is een sterke relatie gevonden tussen de hoeveelheid eDNA en de biomassa. Mogelijk dat eDNA metabarcoding op termijn toegepast kan worden voor de KRW-beoordeling. Voor het zover is zullen verschillende stappen doorlopen moeten worden, waaronder het vaststellen van de benodigde bemonsteringsstrategie, het bepalen van geschikte visindicatoren en het hiervoor aanpassen en kalibreren van de vismaatlaten. RAVON gaat samen met STOWA en waterschappen dit jaar een vervolgonderzoek uitvoeren. Dat onderzoek richt zich op het optimaliseren van de strategie voor monsternamen op waterlichaamniveau. Doel is een kosteneffectieve strategie ontwikkelen om voor een waterlichaam de relatieve hoeveelheid vis per soort met eDNA betrouwbaar te kunnen kwantificeren.

V





Polder Berkel is een lijnvormig water dat onderdeel uitmaakt van waterlichaam Polder Berkel.

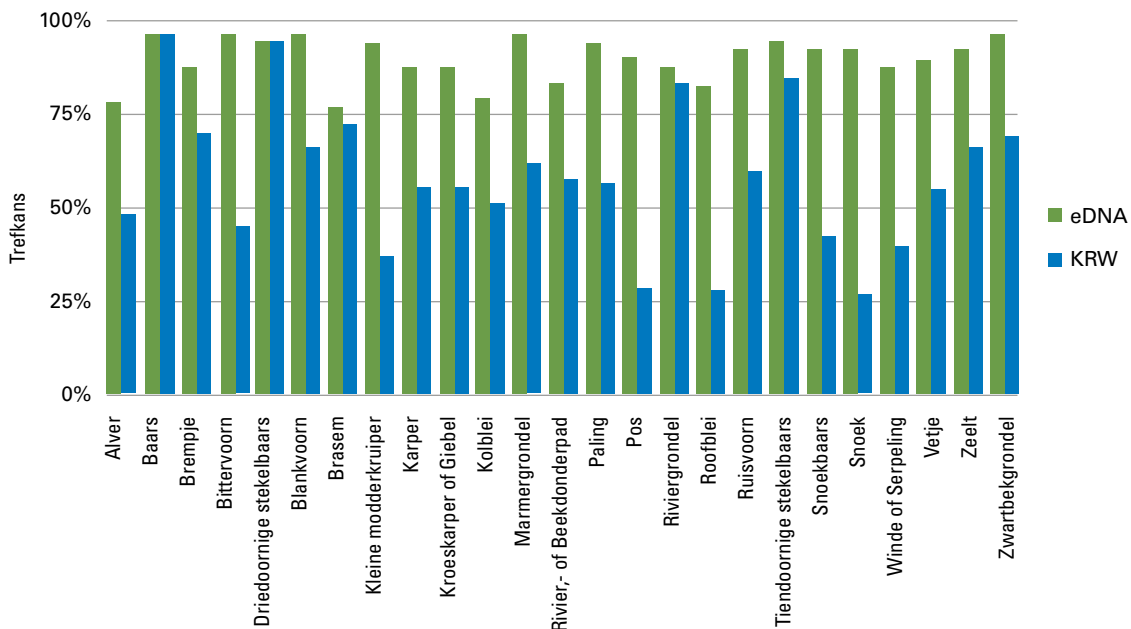
Geraadpleegde literatuur

Herder J.E. & J. Kranenborg, 2016. eDNA metabarcoding vissen – Verkennend onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring, RAVON/STOWA rapport 2016-19.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A. J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E. and Dejean, T. (2016), Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, 25: 929–942. doi:10.1111/mec.13428.



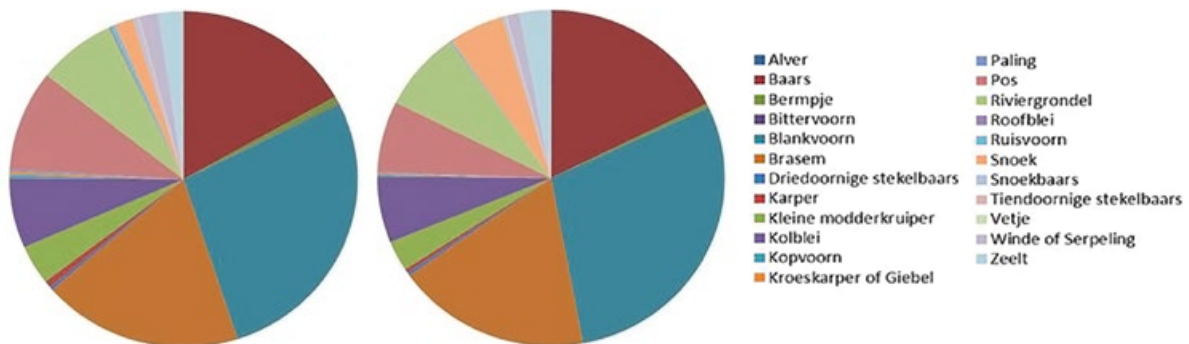
Trefkans per soort - eDNA versus KRW



Trefkans per soort met eDNA en in de KRW-visbemonstering (per traject). Uitgedrukt als het percentage van alle trajecten waarop de soort met één van beide (eDNA of KRW-visbemonstering) is vastgesteld. In de grafiek zijn enkel soorten opgenomen die op 7 of meer locaties voorkwamen.

Essche Stroom A

Essche Stroom B



Reproduceerbaarheid van de eDNA metabarcoding-analyse van één monster uit de Essche stroom; het monster is na extractie in duplo geanalyseerd (A en B). De figuren geven de aangetroffen proporties eDNA sequenties per soort weer.