

Grote vissoorten laten relatief weinig DNA-sporen in het water achter.

eDNA: game changer

voor KRW-vismonitoring?

Sinds 2013 vindt in Nederland onderzoek plaats naar de toepassing van eDNA-metabarcoding voor de Kaderrichtlijn Water-vismonitoring. De resultaten zijn veelbelovend: deze hightech-methode detecteert meer soorten waarbij zelfs de eDNA-verhoudingen tussen aanwezige soorten onderling te meten zijn.

TEKST

Jelger Herder, RAVON
Jan Kranenbarg, RAVON
Alice Valentini, Spyggen

ILLUSTRATIES

Jelger Herder en RAVON

Als onderdeel van de Kaderrichtlijn Water-monitoring wordt onder meer de visstand bemonsterd. Daar waar dat traditioneel gebeurt met vangtuigen zoals de zegen, de kuil en elektrovisserij, is de Environmental DNA (eDNA)-methode de laatste jaren wereldwijd sterk in opkomst. Met deze methode wordt de aanwezigheid van vissoorten aangetoond via DNA-sporen

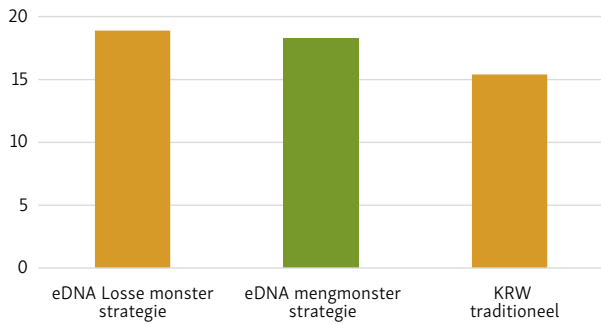
die vissen in het water achterlaten. De eerste toepassing in Nederland – in 2011 – richtte zich specifiek op de grote modderkruiper, waarna al snel eDNA-metabarcoding volgde. Daarbij wordt de aanwezigheid van alle vissoorten gelijktijdig geanalyseerd (zie kader p. 11). In 2013 startte RAVON in samenwerking met SPYGEN, de STOWA en de waterschappen een onderzoek om te achterhalen of eDNA-metabarcoding een alternatief kan bieden voor de huidige KRW-visbemonsteringen.

Testen in verschillende watertypen

In 2013 zijn als eerste stap de uitkomsten van eDNA-metabarcoding

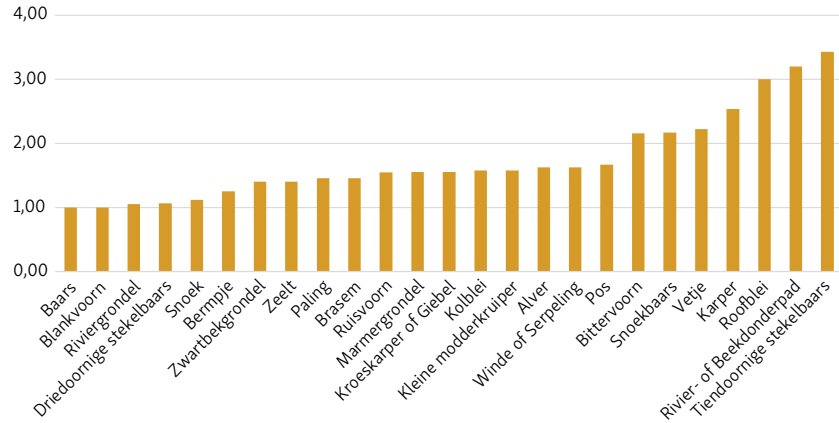
vergeleken met de resultaten van de KRW-visstandbemonsteringen. Hiervoor werden achttien waterlichamen (beken en lijnvormige stilstaande wateren) op negentien trajecten onderzocht. Gezien de positieve resultaten is in 2015 een groter aantal wateren (55 waterlichamen) onderzocht, variërend van beken en kleine rivieren, polder-sloten en kanalen, meren, petgaten en laagveenplassen tot brakke wateren. De eDNA-monsters zijn steeds voorafgaand aan de KRW-visstandbemonstering verzameld. Hierbij werden binnen de beviste trajecten middels eDNA-metabarcoding gemiddeld zestig procent meer soorten aangetroffen dan in de

Gemiddeld aantal soorten per waterlichaam per strategie



Uit een vergelijking met het gemiddeld aantal gedetecteerde soorten per monsterstrategie komt de effectiviteit van de eDNA-methode duidelijk naar voren.

Detectie per soort met eDNA t.o.v. KRW



Vergelijking tussen de trefkans per traject met eDNA t.o.v. de KRW. Een waarde van 1 geeft een gelijke trefkans tussen beide methoden weer. Een waarde van 2 geeft aan dat een soort 2x zo vaak is aangetroffen met eDNA t.o.v. van de KRW-visstandbemonstering.

KRW-visstandbemonsteringen. Binnen stromende wateren was dit tachtig procent meer en in meren en plassen dertig procent meer. Het hogere percentage in stromende wateren is te verklaren doordat daar ook een deel wordt gedetecteerd van het eDNA afkomstig van vissen stroomopwaarts van het monstertraject. In kleinere beken gaat het om trajecten van 100 tot 1000 meter, terwijl het in grote

rivieren om wel tientallen kilometers kan gaan bij soorten die in hoge dichtheden voorkomen. Per vissoort is ook bekeken hoeveel hoger de trefkans met eDNA was ten opzichte van de KRW-visbemonstering. Algemene soorten als baars en blankvoorn worden met beide methoden net zo goed gedetecteerd, maar voor de overige soorten kan de trefkans met eDNA tot wel drie keer hoger liggen.

Naar een beoordeling op waterlichaamniveau

De ecologische beoordeling voor de KRW vindt plaats op waterlichaamniveau. In 2016 is daarom ingestoken op een beoordeling op waterlichaamniveau voor de vergelijking tussen eDNA-metabarcoding en de KRW-visbemonstering met als neven doel om tot een optimale eDNA-monsterstrategie te komen. In totaal zijn hiervoor negen waterlichamen – waaronder meren, stromende en stilstaande lijnvormige wateren – parallel aan de KRW-bevissingen bemonsterd met eDNA-metabarcoding. Per waterlichaam is per drie los bemonsterde trajecten ook een mengmonster verzameld over dezelfde drie trajecten samen. Zo is getest of de goedkopere bemonsteringstrategie van mengmonsters vergelijkbare resultaten geeft. Gemiddeld zijn per waterlichaam drieëntwintig procent meer soorten gedetecteerd in de losse monsters en negentien procent meer soorten in de mengmonsters in vergelijking met de hele KRW-bevissing. Met eDNA zijn slechts in enkele gevallen soorten gemist die wel gevangen waren. Dit ging zonder uitzondering om soorten die in zeer lage dichtheden voorkwamen (minder dan 0,001 kilo per hectare). De verhouding in eDNA tussen soorten was betrouwbaar te meten: de verhoudingen verkregen uit de losse monsters kwamen nagenoeg overeen met die uit de mengmonsters in acht



Ook de visstand in de Bovenslinge is met behulp van de eDNA-methode bemonsterd.

van de negen waterlichamen. Ook een test in het lab waarbij een monster twee keer werd geanalyseerd, gaf gelijke verhoudingen tussen soorten. Geconcludeerd kon worden dat de twee tot drie eDNA-mengmonsters (drie trajecten in één) per waterlichaam volstonden voor een goed beeld van de aanwezige vissoorten en de verhoudingen in eDNA tussen deze soorten.

eDNA-metabarcoding

De in dit onderzoek toegepaste eDNA-metabarcoding methode werkt als volgt:

1. Met speciale filters worden in het veld over een groot oppervlak (tot 2.250 meter) en met een groot volume (tot 40 liter) eDNA-monsters verzameld;
2. In het lab wordt uit deze filters DNA geëxtraheerd;
3. Alleen het DNA van vissen wordt met behulp van universele primers voor vissen vermeerderd;
4. Het vermeerderde DNA wordt gesequenced waarbij per fragment de DNA-code (sequentie) wordt bepaald;
5. De aangetroffen DNA-codes worden gematched met de codes in een referentiedatabase met daarin de DNA-codes van alle in Nederland voorkomende vissoorten. Bioinformatisch worden sequentiefouten er uitgefilterd, zodat een betrouwbare soortenlijst ontstaat met het aantal sequenties/DNA-fragmenten per soort.

Biomassa en aantallen

Bij eDNA gaat het, zeker bij zeldzamere soorten, om zeer lage concentraties eDNA in het water. Verschillende studies laten een significant verband zien tussen de dichtheid van vissen in aquaria en de absolute eDNA-concentraties. Kanttekening is dat in deze situaties wordt gewerkt met onnatuurlijk hoge dichtheden aan vis, tot wel twee tot vijf kleine vissen per liter water. Dit resulteert in zeer hoge eDNA-concentraties die niet representatief zijn voor natuurlijke omstandigheden. Met

eDNA-metabarcoding is het wel mogelijk om semi-kwantitatief te kijken. De verhoudingen in eDNA tussen soorten zijn middels een representatieve bemonstering (grote volumes en lange trajecten) betrouwbaar in kaart te brengen. Door het aandeel DNA-sequenties van een soort af te zetten tegen het totale aantal DNA-sequenties van vissen, is te bepalen of soorten algemeen of zeldzaam zijn.

Toch is het aandeel in eDNA-sequenties niet één op één te vertalen naar het aandeel in biomassa of aantallen. Zo kan eDNA van soorten beter of slechter vermeerderd worden in de analyse doordat de primers (kleine stukjes DNA die gebruikt worden als startpunt voor de PCR) bij sommige soorten mismatches hebben met het DNA-fragment dat ze vermeerderen. Ook laten kleine en jonge vissen door hun relatief grote lichaamsoppervlak meer eDNA achter dan grote vissen. Dit speelt bijvoorbeeld een rol bij karper, een soort die zich in Nederland op maar weinig plaatsen voortplant waardoor er vaak alleen grote volwassen exemplaren aanwezig zijn. Die laten relatief weinig DNA achter, terwijl ze wel een groot deel van de biomassa kunnen uitmaken.

Toekomstige inzet

Voor vismonitoring heeft eDNA-metabarcoding grote potentie en in vergelijking met traditionele visstandbemonstering zijn er een aantal voordelen. Zo is de methode:

- (veel) kansrijker in het detecteren van vissoorten;
- nauwkeurig en reproduceerbaar;
- eenvoudig te standaardiseren;
- visvriendelijk;
- kosteneffectief.

De komende jaren wordt onderzocht of en hoe eDNA metabarcoding als methode voor de KRW-visstandbeoordeling inzetbaar is. Waterlichamen krijgen een score voor de ecologische kwaliteit (EKR-score vissen), die wordt berekend via zogenaamde maatlatten op basis van de aangetroffen soorten en verhoudingen tussen soorten. In het lopende onderzoek wordt de dataset met eDNA-gegevens uitgebreid zodat alle regio's en watertypen vertegenwoordigd zijn met daarbinnen de

gradiënt van wateren van hoge tot lage ecologische kwaliteit (EKR-scores voor vissen). Zo is te bepalen of met de eDNA-methode een vergelijkbare beoordeling mogelijk is als met de huidige KRW-visstandbemonstering. Hierbij worden twee sporen verkend:

1. Gebruiken van de huidige maatlatten. eDNA-gegevens worden in de reeds ontwikkelde maatlatten gegoten waarbij in plaats van verhoudingen in biomassa/aantallen eDNA-verhoudingen worden gebruikt. Dit zou de eenvoudigste manier zijn om de eDNA-methode te implementeren. Er hoeven dan hooguit kleine aanpassingen te worden gemaakt aan de reeds ontwikkelde en onderbouwde maatlatten.
2. Op eDNA gebaseerde maatlatten. De huidige maatlatten zijn niet ontwikkeld voor eDNA-data, waardoor het in sommige gevallen lastig kan zijn om de eDNA-gegevens toe te passen. Bij een visgemeenschapsbeoordeling op basis van eDNA ontstaat in vergelijking tot het vangen van vissen met netten een beter beeld van de soortdiversiteit, maar dit is niet uit te drukken in gevangen aantallen of kilo's per soort (wel in de algemeenheid van soorten ten opzichte van elkaar). Om hier rekening mee te kunnen houden, zullen suggesties worden gedaan voor op eDNA gebaseerde maatlatten.

Meerdere Europese landen ontwikkelen en valideren momenteel eDNA-methoden in relatie tot toepassing voor de KRW-monitoring. Hierbij wisselen ze kennis en gegevens uit binnen het Europese COST-project DNAqua.net. RAVON, SPYGEN nemen actief deel in de werkgroepen en RAVON leidt de subwerkgroep over maatlatten en vissen. De komende jaren zal duidelijk worden of en hoe eDNA-metabarcoding een alternatief kan vormen voor de KRW-visbemonsteringen. ■

Ga voor de geraadpleegde literatuur naar www.invisionair.nl