

Speuren in een glas water

Toepassingsmogelijkheden eDNA voor de KRW-vismonitoring

TEKST

Jelger Herder, RAVON
Jan Kranenborg RAVON
Bart Schaub,
Hoogheemraadschap van Rijnland
Mike Dijkstra,
Hoogheemraadschap van Rijnland

ILLUSTRATIES

Jelger Herder en RAVON



Kleinere vissen laten relatief veel eDNA achter in het water en zijn daardoor goed waar te nemen met behulp van de eDNA-bemonstering.

Met behulp van eDNA-metabarcoding kan de visgemeenschap in kaart worden gebracht via DNA-sporen die vissen in het water achterlaten. Hoe verhouden de resultaten zich ten opzichte van huidige KRW-visstandbemonsteringen en is het mogelijk tot vergelijkbare beoordelingen te komen? Van 2016 tot 2021 is een grootschalig onderzoek uitgevoerd om hier een antwoord op te geven.

Vanuit de KRW zijn doelen opgesteld voor de waterkwaliteit. Deze worden gemeten via kwaliteitselementen waaronder de aanwezigheid van vissen, waterplanten, algen en macrofauna. De toestand van deze zogenaamde biologische kwaliteitselementen dient minimaal eens in de zes jaar te worden gemonitord.

Voor vissen gebeurt dit momenteel met conventionele methoden zoals netten en elektrisch vissen. In de periode 2016-2020 heeft RAVON, in samenwerking met de STOWA en 15 waterschappen, onderzocht in hoeverre eDNA-metabarcoding bruikbaar is voor de KRW-vismonitoring.

Onderzoekopzet

In totaal zijn 83 waterlichamen verspreid over Nederland en de verschillende watertypen bemonsterd, parallel aan de huidige KRW-visstandbemonstering. Omdat het niet mogelijk is voor ieder individueel KRW-watertype een voldoende grote dataset te genereren, zijn de watertypen geaggregeerd op basis van vorm (lijnvormig versus meren), stroomsnelheid (stilstaand versus

stromend) en zoutgehalte (brakke wateren apart). Hierbij is onderscheid gemaakt in de volgende vier watertypecategorieën:

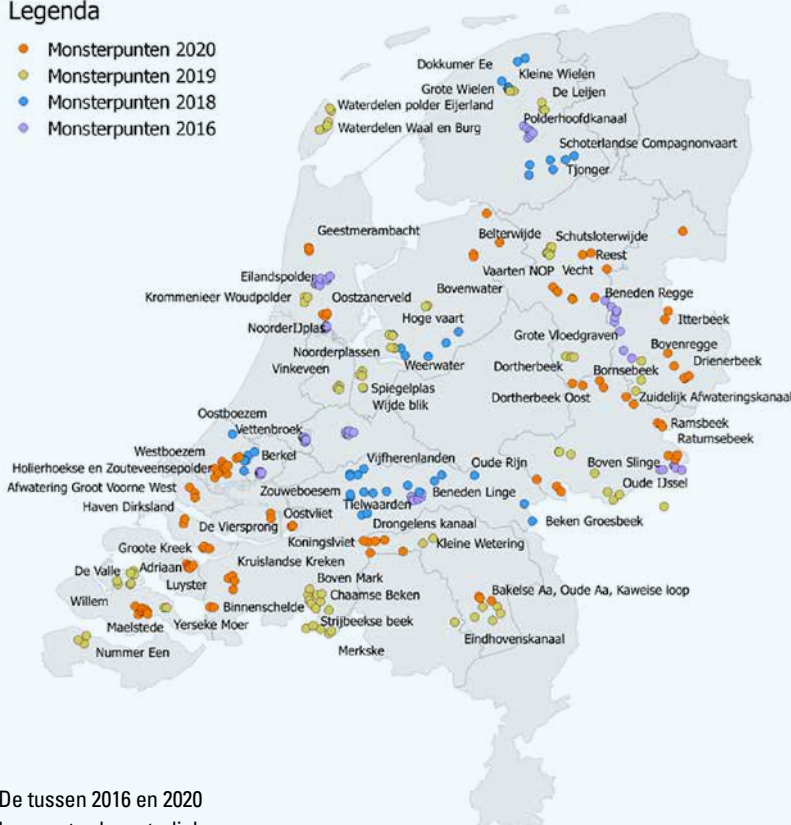
- Lijnvormig stilstaand water (sloten, kanalen en polder-systemen),
- meren/plassen,
- stromend wateren (R-typen);
- brakke wateren.

Bij de selectie van waterlichamen is rekening gehouden met een goede verdeling over de gradiënt van waterlichamen van hoge tot lage ecologische kwaliteit (EKR-scores voor vissen). Zo is een representatieve steekproef verkregen van de in Nederland aanwezige waterlichamen.



Legenda

- Monsterpunten 2020
- Monsterpunten 2019
- Monsterpunten 2018
- Monsterpunten 2016



De tussen 2016 en 2020 bemonsterde waterlichamen.

Huidige methode KRW-visstandbemonsteringen

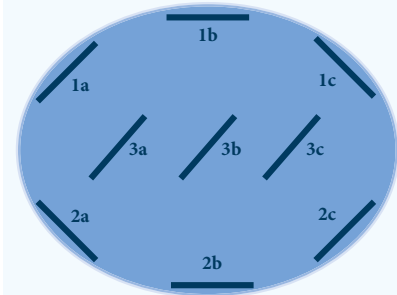
De KRW-visstandbemonsteringen zijn uitgevoerd conform het Handboek Hydrobiologie (STOWA, 2014). De toegepaste methodieken betroffen doorgaans elektrisch vissen of met de zegen en in de helft van de gevallen een combinatie van beiden. Op enkele locaties is daarnaast ook gevist met een stortkuil of met fuiken. De trajecten variëren van 250 meter (bemonsterd met zegen of elektro) tot een kilometer (stortkuil) waarbij in de regel ten minste 7,5 procent van het oppervlak van een waterlichaam wordt bemonsterd.

Monsterstrategie en ruimtelijke spreiding eDNA

Eerder onderzoek heeft laten zien dat een monsterstrategie met twee tot drie eDNA-mengmonsters

voldoende informatie geeft over de voorkomende soorten (er zijn 17 procent meer soorten aangetoond met eDNA dan in de reguliere KRW-visstandbemonsteringen) en verhouding in eDNA-sequenties tussen soorten (mengmonsters hadden zeer vergelijkbare verhoudingen ten opzichte van drie keer zo veel losse eDNA-monsters). Er is daarom als basis gekozen voor het toepassen van drie eDNA-mengmonsters per waterlichaam. Het is een gegeven dat eDNA niet gelijkmatig over een waterlichaam is verdeeld. In klein stilstaand water verspreidt het zich niet ver van de bron. In meren en plassen kan wind en golfwerking echter zorgen voor een verdere verspreiding. In stromend water wordt het eDNA verdund en meegevoerd waarbij de concentraties afnemen met de afstand tot de bron. Grote monstervolumes

Mengmonsters:
 $1a+1b+1c = \text{oever 1}$
 $2a+2b+2c = \text{oever 2}$
 $3a+3b+3c = \text{open water}$



Schematische weergave van de bemonsteringsstrategie voor meren en plassen. Er worden drie mengmonsters verzameld, twee in de oever (1 en 2) en één in het open water (3). Ieder mengmonster bestaat uit drie subtrajecten van 750 meter (a, b en c).

Visstandonderzoek 2.0: eDNA bemonstering vanuit de boot.



De trefkans van een rivierdonderpad is met behulp van eDNA technieken groter dan met de reguliere bemonsteringsmethode.



(>10 liter) en een goede ruimtelijke spreiding over langere trajecten zijn daarom belangrijk voor een representatieve weergave van de visgemeenschap, inclusief de zeldzamere soorten. Hier is de monstermethode op aangepast. In grote wateren zoals meren, plassen, grote kanalen en kleine rivieren, zijn trajecten al varend vanuit een boot bemonsterd. Met behulp van een peristaltische pomp is hierbij continu water opgepompt in een 60 liter ton met steriele zak. In meren zijn eDNA-mengmonsters verzameld (twee langs de oevers, één in open water) die ieder bestaan uit drie subtrajecten van 750 meter waarop 15 liter water wordt verzameld. In totaal is er per mengmonster 45 liter verzameld over 2250 meter. In grotere lijnvormige wateren is per eDNA mengmonster 45 liter verzameld over een traject van 1.600 meter waarbij beide oevers en het midden om en om (per 100 meter) zijn bemonsterd. In kleine wateren is op drie subtrajecten van 250 meter ieder 10 liter bemonsterd middels het verzamelen van kleine schepjes water vanaf de oever of wadend. In totaal is er per mengmonster 30 liter verzameld over 750 meter.

Verwerking monsters en analyses

De verzamelde mengmonsters zijn direct in het veld gefiltreerd, gebruikmakend van VigiDNA-filters (poriegrootte 0,45µm). Na filtratie is een conserveringsbuffer toegevoegd om verdere afbraak van eDNA te stoppen. In het lab (SPYGEN) is het DNA uit de filters geëxtraheerd en is middels PRC (12 replica's) het DNA van vissen vermeerderd met

behulp van universele primers voor vissen (Valentini et al., 2016). Het vermeerderde DNA is vervolgens gesequenced waarbij per fragment de DNA-code (sequentie) is bepaald. De aangetroffen DNA-codes zijn gematched met de codes in een referentiedatabase met daarin de DNA-codes van alle in Nederland voorkomende vissoorten. Tot slot zijn bio-informatische sequentiefouten eruit gefilterd, zodat een betrouwbare soortenlijst ontstaat met het aantal sequenties/DNA-fragmenten per soort.

Trefkans soorten

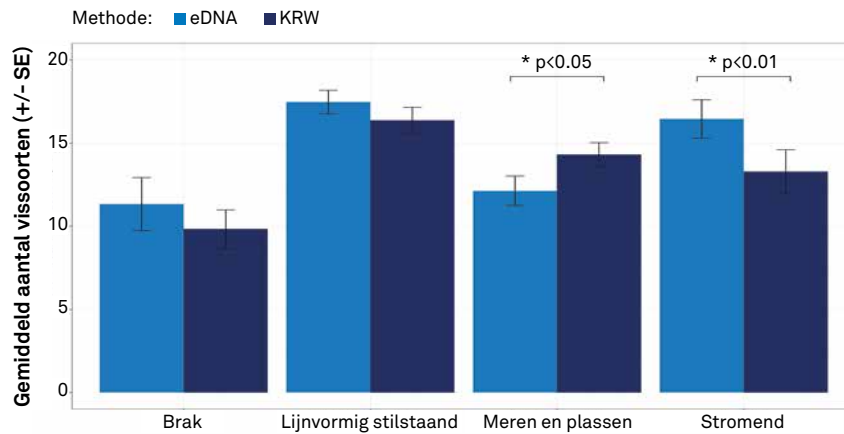
Net als in eerdere onderzoeken bleek de trefkans voor de meeste vissoorten hoog met de eDNA-methode. Van 35 soorten hadden

29 soorten (83 procent) de hoogste trefkans met eDNA. Zes soorten (17 procent) werden vaker aangetroffen met de huidige KRW-visstandbemonstering. Voorbeelden van soorten die minder goed werden aangetroffen met eDNA waren graskarper (waarvan vaak slechts enkele individuen in een water aanwezig zijn), spiering en alver (soorten van open water) en kolblei (hiervan is het onderzochte DNA-fragment van een deel van de populatie niet te onderscheiden van brasem en wordt wel opgepikt maar kan niet op soort gebracht worden). Voorbeelden van soorten die (veel) beter werden aangetroffen met eDNA zijn lastiger te vangen soorten en soorten die vaak in lage dichtheden voorkomen als rivierdonderpad, grote modderkruiper en exoten als blauwband, zonnebaars en Pontische stroomgrondel. In stromend water, lijnvormig stilstaand water en brak water, worden gemiddeld meer soorten aangetroffen met eDNA dan met de reguliere KRW-visstandbemonstering. In meren en plassen was dit niet het geval, waarschijnlijk doordat de gehanteerde bemonsteringsinspanning met eDNA in dit watertype te laag was en in

In stromend water, lijnvormig stilstaand water en brak water, worden gemiddeld meer soorten aangetroffen met eDNA dan met de reguliere KRW-visstandbemonstering



Het voorkomen van alvers blijkt beter aan te tonen met behulp van de conventionele KRW-methode.

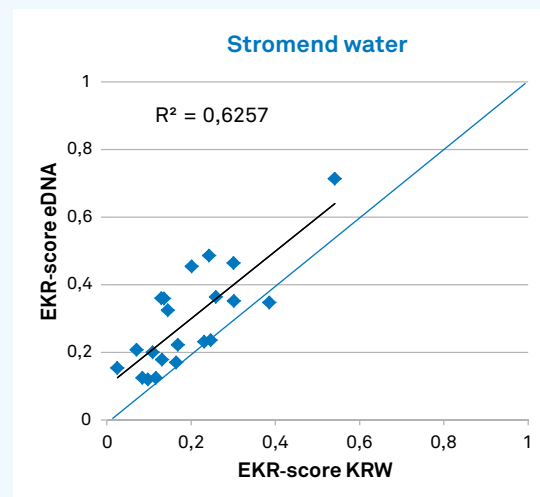
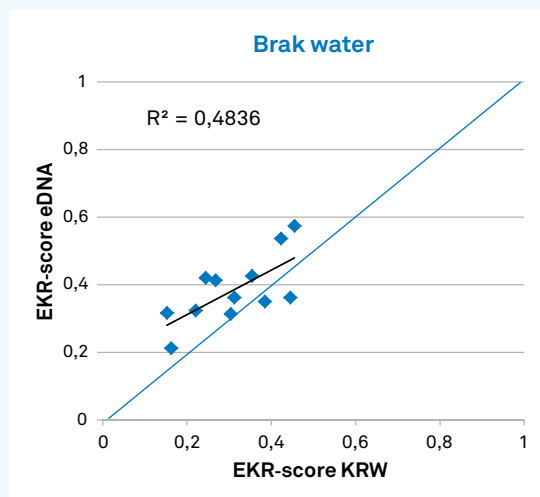
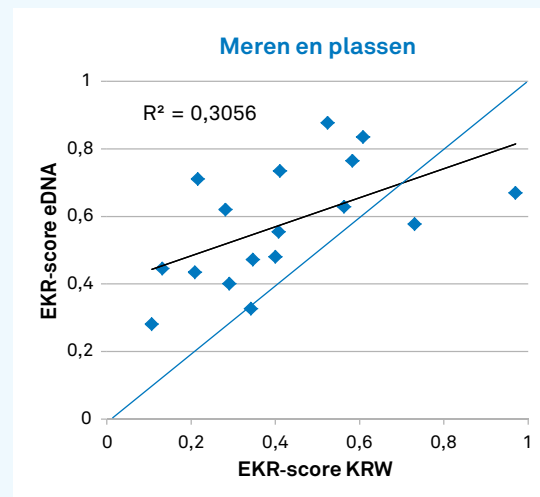
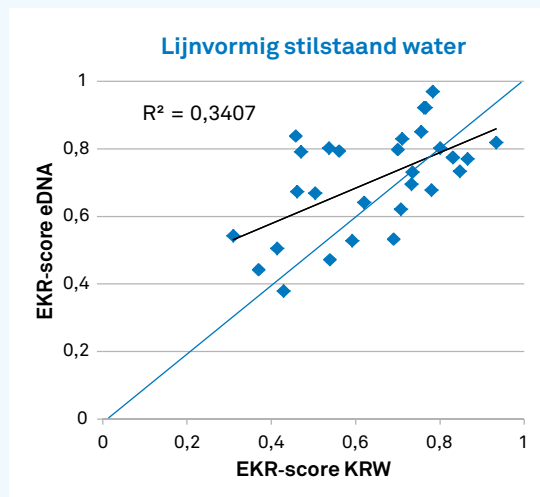


Gemiddeld aantal gedetecteerde vissoorten per KRW-waterlichaam met beide methoden (eDNA en KRW-bevissing) voor vier watertype-categorieën. De verschillen zijn getoetst met een gepaarde t-test (een * geeft aan dat het verschil significant was).

enkele laagveenplassen mogelijk door de binding van eDNA aan organisch materiaal.

Bepaling ecologische kwaliteit met eDNA

Een belangrijk onderdeel van het onderzoek betrof het toetsen of op basis van eDNA vergelijkbare Ecologische Kwaliteitsratio's (EKR) verkregen konden worden, als in de huidige KRW-vismonitoring. Het blijkt dat vismaatlaten op basis van soortdiversiteit (aantal of aantalspercentage indicatorsoorten) goed konden worden gereproduceerd met de gegevens verkregen met op basis van eDNA. Voor stromend



Vergelijking EKR-scores in de vier watertypen berekend met gegevens verkregen met de eDNA-methode en vanuit de KRW-visstandbemonstering. De blauwe lijn geeft ter indicatie een gelijke score met eDNA en KRW weer.

water, waarbij drie van de vier maatlatten gebaseerd zijn op soortdiversiteit, was de overeenkomst in EKR-scores het hoogst, gevolgd door brak water en lijnvormige stilstaande wateren. Voor de meren en plassen, die gebruik maken van maatlatten gebaseerd op aandeel biomassa, waren de overeenkomsten matig. De belangrijkste reden hiervoor is dat het aandeel in eDNA-sequenties niet één op één te vertalen is naar het aandeel in biomassa. In brakke wateren zijn de bestandsschattingen vanuit de KRW-visstandbemonsteringen daarnaast incompleet doordat de vangsten van de fuiken niet worden meegenomen en er door het hoge zoutgehalte niet elektrisch wordt bevestigd maar enkel met leusnet.

Vervolg

Het onderzoek heeft uitgewezen dat de eDNA-methode zeker potentie heeft voor de KRW-beoordeling voor vissen. Voor stromend water (en mogelijk brak water) zouden via een correctie voor de iets hogere trefkans (aanpassing van de klassengrenzen) de EKR-scores kunnen worden gereproduceerd in de huidige maatlatten. De huidige maatlatten zijn ontworpen op basis van conventionele vismethoden. De uitkomsten van de eDNA-methode laten zich moeilijk gieten in de maatlatten die gebruikmaken van het aandeel in aantallen of biomassa die voor sommige watertypen gehanteerd worden. Er wordt momenteel door de STOWA gewerkt aan een nieuwe beoordelingssystematiek waarin eDNA waarschijnlijk een rol gaat spelen. Hierbij is het ook de wens dat deze niet enkel een beoordeling geeft maar ook diagnostisch is. Dat wil zeggen: aangeeft waaraan het ligt dat een EKR-score nog niet optimaal is zodat vervolgens de juiste maatregelen kunnen worden genomen. ■

Geraadpleegde literatuur

Ga voor de geraadpleegde literatuur naar www.invisionair.nl



Kwantificering

Voor het vergelijken van visgemeenschappen is naast de aan- of afwezigheid van soorten, ook hun abundantie van belang. Vanuit de huidige KRW-visstandbemonsteringen wordt een bestandschatting berekend met daarin aantallen of biomassa per hectare. Vanuit de eDNA-metabarcoding worden de relatieve verhoudingen tussen soorten verkregen (aandeel in eDNA-sequenties) maar dit is niet direct te vertalen naar aantallen of biomassa. Zo laten kleine vissen relatief veel eDNA achter ten opzichte van hun lichaamsgewicht doordat ze in verhouding een groter lichaamsoppervlak hebben en vaak een hoger metabolisme. Ook zijn er soortspecifieke verschillen op basis van fysiologie en gedrag. Bij soortspecifiek eDNA-onderzoek, gericht op één doelsoort, kan middels qPCR (kwantitatieve PCR) of ddPCR (droplet digital PCR) de hoeveelheid eDNA in een monster worden bepaald. Daarbij speelt echter wel de limiet voor kwantificering (LOQ): de minimale hoeveelheid eDNA in een monster dat nodig is voor een betrouwbare kwantificering. Voor minder algemeen voorkomende vissoorten zijn de concentraties eDNA in het water in de regel te laag voor dergelijke absolute kwantificering. Wel kan het aantal positieve PCR-analyses van de 12 PCR-replica's die op een monster worden uitgevoerd een indicatie geven voor de hoeveelheid eDNA (bijvoorbeeld 8/12 t.o.v. 1/12). Bij eDNA-metabarcoding wordt middels universele primers vissen eDNA vermeerderd waarna er zo een 400.000 sequenties worden uitgelezen. Daaruit kan het aandeel in eDNA-sequenties per soort in een monster worden bepaald. Dit geeft echter nog geen informatie over de absolute hoeveelheid eDNA per soort dat in een monster aanwezig is. In een recent onderzoek in de Donau is daar een slimme oplossing voor getest. Op ieder monster zijn additioneel een drietal qPCR-analyses uitgevoerd waarmee de absolute hoeveelheid vissen-eDNA in het monster is bepaald. Door dit te koppelen aan de verhoudingen tussen soorten verkregen vanuit de metabarcoding en het bemonsterde watervolume, kon per soort de absolute hoeveelheid eDNA (sequenties per liter water) worden vastgesteld. Deze waarden lieten een goede correlatie zien met vanuit de conventionele bevissingen vastgestelde aantallen en biomassa per soort. Dit biedt de potentie voor zowel spatiale (tussen locaties) als temporele (in de tijd) vergelijkingen. Hierbij dient de kanttekening gemaakt te worden dat eDNA-productie en -afbraak van vele factoren afhankelijk is en ook waterafvoer (verdunding) een rol speelt.