

De dichtheid van de rode Amerikaanse rivierkreeft bepalen: **vangen of eDNA?**

Beheerders hebben er belang bij om te weten hoeveel uitheemse rivierkreeften zich bevinden in hun watersysteem, omdat deze dieren een grote impact kunnen hebben op hun omgeving. Momenteel worden kreeften gevangen met (beaasde) korven om de (relatieve) dichtheid te bepalen. Maar meten van eDNA is minder arbeidsintensief, vaak goedkoper én er zijn geen vistoestemming en vergunning nodig. Kan het meten van eDNA van kreeften een betrouwbaar alternatief vormen?

Annelies van de Craats, Kees van Bochove, Casper Cusell & Ernst Raaphorst

Een goede dichtheidsbepaling van de rivierkreeften is essentieel om de impact van deze invasieve exoot vast te stellen. Het bepalen van absolute dichtheden, bijvoorbeeld met merk-terugvangst-onderzoek, is zeer arbeidsintensief. In praktijk wordt daarom vaak gewerkt met relatieve dichtheden door middel van een gestandaardiseerde meetinspanning (meestal beaasde korven) maar ook dit vergt een behoorlijke inzet van tijd en materiaal. In 2019 is, in aanvulling op onderzoek naar rode Amerikaanse rivierkreeft (Tangerman et al., dit nummer), onderzocht of met eDNA een betrouwbare inschatting van de populatiegrootte van deze soort kan worden gemaakt. Deze methode zou het arbeidsintensieve fuikwerk kunnen vervangen, waardoor op grotere schaal (en vaker) voor lagere kosten inzicht verkregen kan worden in de dichtheden van de rode Amerikaanse rivierkreeft.

Onderzoeksmethode

Per meetlocatie zijn kreeften (rode Amerikaanse rivierkreeft) gevangen met beaasde korven én is de hoeveelheid eDNA bepaald uit monsters van oppervlaktewater. De inspanning van twaalf beaasde korven over een oevertraject van 50 m wordt beschouwd als goede maatstaf voor het vergelijken van dichtheden van rivierkreeften tussen gebieden (Hop, 2020). Eind april en begin mei 2019 zijn in totaal 75 meetlocaties bemonsterd in dertien gebieden verspreid over West- en Midden-Nederland. De selectie van de onderzoeksgebieden en meetlocaties is gebaseerd op criteria die zijn gebruikt bij een correlatief onderzoek naar standplaatscondities en relatieve dichtheid van rode Amerikaanse rivierkreeft (Tangerman et al., dit nummer).

Aas-fuik-methode

Bij de hier toegepaste aas-fuik-methode is de relatieve grootte van de populatie ingeschat op basis van de opbrengst van twaalf korven per locatie en met 20 mm Halibut vismeelpellets per korf als aas. Deze zijn steeds tenminste één nacht (circa twintig uur) aanwezig geweest, voordat ze geteld en gelegeerd werden. In de korven was een ontsnappingsring van 25 mm aanwezig om bijvangst te laten ontsnappen, maar waardoor ook kleine kreeften konden ontsnappen. Het aantal kleine kreeften (< 6 cm) in een populatie wat niet gevangen wordt, is in Nederland het hoogst meteen na de leg in september. Daarna neemt dit aantal af door onder andere predatie, maar zijn de aantallen tijdens de periode van dit onderzoek (eind april tot begin mei) nog steeds hoger dan de aantallen kreeften die wel gevangen worden (Kanters, 2019). Bij het legen van de korven is op locatie de gehele vangst (inclusief bijvangst) gedetermineerd op soort en genoteerd per fuik.

eDNA-methode

Bij deze methode wordt de grootte van de populatie ingeschat op basis van de hoeveelheid “environmental DNA” (eDNA) dat op een meetlocatie aanwezig is. Dit is DNA dat in het

milieu (environment) achterblijft wanneer een soort hierin aanwezig is, afkomstig van bijvoorbeeld huidcellen, uitwerpselen en in geval van kreeften ook van het oude pantser na verschaling. Door te kijken naar soortspecifiek eDNA kan de aanwezigheid van een soort in het milieu worden bepaald. Van sommige soorten is zelfs aangetoond dat er een relatie bestaat tussen de eDNA-concentratie en de populatiedichtheid, zoals bij de grote



(Foto: Mitzi Jans)

modderkruiper (De Jong & Van Bochove, 2016). In het huidige onderzoek is gekeken of een dergelijke relatie ook aanwezig is voor de rode Amerikaanse rivierkreeft in het oppervlaktewater.

Deze eDNA-methode bestaat grofweg uit drie stappen: (1) het verzamelen oppervlaktewatermonsters in het veld, (2) de extractie van eDNA in het laboratorium, (3) het bepalen van de eDNA-concentratie van rode Amerikaanse rivierkreeft in het monster in het laboratorium.

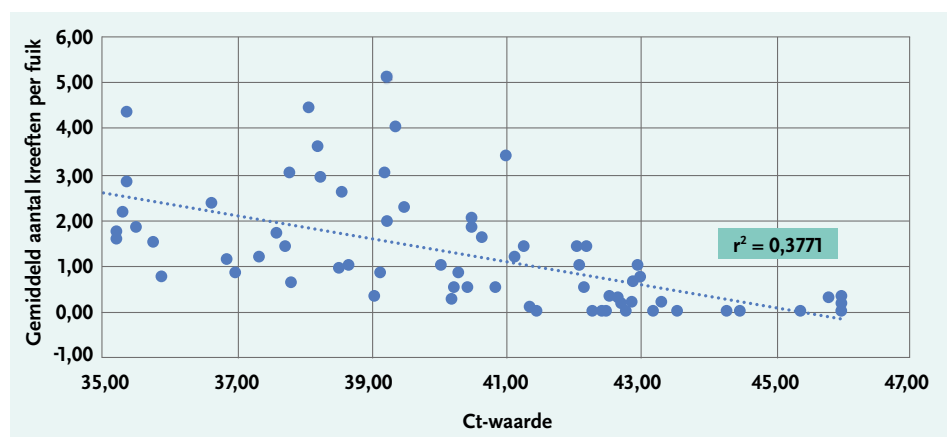
Voor de bemonstering in het veld (stap 1) werd per meetlocatie minstens 1 l water verzameld door middel van 28 schepjes water verspreid over 50 strekkende meter (foto 1). Dit water werd in het veld gefiltreerd; het eDNA blijft op het filter liggen. Vervolgens werd het filter met eDNA geconserveerd in een buisje en getransporteerd naar het laboratorium. In het laboratorium werd het eDNA geëxtraheerd (stap 2). Het resultaat is een buisje dat uitsluitend water en DNA bevat.

Het bepalen van de eDNA-concentratie in het monster (stap 3) gebeurt op basis van een qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Uitgebreide uitleg van de qPCR-methode is na te lezen in Vrålstad et al. (2009). Bij PCR doorloopt het monster met DNA een aantal keer een PCR-cyclus. In elke cyclus wordt het eDNA verdubbeld, wat resulteert in een exponentiële vermeerdering. Elke keer dat de PCR-cyclus doorlopen is, wordt gekeken hoeveel DNA er op dat moment in het monster aanwezig is. Elke qPCR-analyse is met twaalf replica's uitgevoerd: per meetlocatie zijn dus twaalf qPCR's uitgevoerd.

Er zijn vervolgens twee rekenmethodes beschikbaar om de concentratie eDNA in een monster te bepalen. De eerste is de Ct-waarde (Cycle threshold), het aantal PCR-cycli dat nodig is om de hoeveelheid DNA een bepaalde drempelwaarde te laten passeren. Een hoge Ct-waarde indiceert dus een lage eDNA-concentratie, omdat je dan meer PCR-cycli hebt moeten doorlopen om de grenswaarde te bereiken. Bij zeer lage DNA-concentraties is het mogelijk om een concentratie eDNA te schatten op basis van het aantal positieve replica's, zoals eerder is gedaan bij een dichtheidsbepaling van grote modderkruiper (De Jong & Van Bochove, 2016). Bij deze methode doorlopen alle twaalf replica's 55 PCR-cycli. Vervolgens wordt geteld in hoeveel van die replica's eDNA van die soort aanwezig is (een



Foto 1. Bemonstering in het veld. Verspreid langs de oever wordt oppervlaktewater verzameld. (Foto: Mitzi Jans)



Figuur 1. Relatie tussen Ct-waarde en het gemiddelde aantal kreeften per fuik.

positieve replica). Afhankelijk van de initiële concentratie zijn dan weinig of veel van de twaalf replica's positief. De DNA-concentratie van rode Amerikaanse rivierkreeft bleek echter dermate hoog te zijn dat vrijwel alle replica's positief waren, zodat deze kwantificeringstechniek weinig waarde bleek te hebben. Daarom is gekozen om de Ct-waardes te gebruiken om de concentratie eDNA te bepalen.

Resultaten

Om inzicht te krijgen in de relatie tussen de kreeftendichtheid en de hoeveelheid eDNA, is het gemiddelde aantal rode Amerikaanse rivierkreeften per korf per meetlocatie uitgezet tegen de verkregen Ct-waardes van de eDNA-monsters. Uit de resultaten blijkt dat er een verband (r^2 van 0,377) is tussen de Ct-waarde van de eDNA-monsters en het aantal kreeften dat gemiddeld per fuik is gevangen (fig. 1). Dit betreft een matig verband (r^2 van 1 is een sterk verband en 0 is geen verband), waarbij circa 37 % van de variatie in het gemiddeld aantal kreeften dat gevangen is per fuik kan worden verklaard met het gevonden aantal eDNA-moleculen.

Discussie

Bij het vergelijken van deze methodes moet er rekening mee worden gehouden dat zowel de eDNA-metingen als de aas-fuik-methode afwijkingen kunnen vertonen. Met de aas-fuik-methode wordt alleen een steekproef gevangen, waarbij zowel de aantallen, als het aandeel vrouwtjes en mannetjes kan fluctueren afhankelijk van het jaargetijde, de watertemperatuur en de voortplantingscyclus (Janssen & Kampen, 2020). Ook worden bijna alleen adulte individuen (> 6 cm) in de korven gevangen, omdat de kleintjes (< 6 cm) door de ontsnappingsring kunnen. Jonge kreeften vervellen vaker en kunnen dus in verhouding meer eDNA toevoegen aan het systeem, terwijl ze met korven bijna niet gevangen worden. Daarnaast worden de resultaten van de eDNA-methode soms lokaal verhoogd door een dood exemplaar en oude schalen van vervellingen, waarbij de afbraaksnelheid in het water afhankelijk is van allerlei factoren, waaronder microbiële activiteit. Bij de vergelijking van de methodes is het lastig om vast te stellen welke methode nu betrouwbaarder is, omdat de exacte populatiegrootte onbekend is. Het gebruik van eDNA om de aanwezigheid

van kreeften te bepalen is al vaker onderzocht (o.a. Rusch et al., 2020), maar vaak niet in combinatie met dichtheid. Cai et al. (2017) deden dit wel en vonden een correlatie tussen eDNA-concentratie en kreeftendichtheid in het lab ($r^2 = 0,76$). In het veld werd een verband van $r^2 = 0,445$ gevonden tussen eDNA-resultaten en getelde kreeften in een rijstveld. Harper et al. (2018) vonden in een laboratoriumstudie een verschil in Ct-waardes tussen aanwezigheid van één kreeft vs. drie kreeften in een tank. De conclusie van voorliggende studie is dat er mogelijk een verband is tussen de concentratie eDNA van rode Amerikaanse rivierkreeft, maar dat beide gebruikte methodes (eDNA en aas-fuik) niet een op een vergelijkbaar zijn, wat ook blijkt uit de studie van Cai et al. (2017). eDNA-metingen hebben potentie om een geschikt alternatief te zijn om een inschatting te verkrijgen van de populatiedichtheid van rode Amerikaanse rivierkreeft, maar de exacte betrouwbaarheid dient beter te worden onderzocht. Deze studie is dus een eerste goede stap waaruit blijkt dat de methode perspectief biedt, maar dat nader onderzoek hiervoor nodig is. Hierbij moet ook gedacht worden aan de aanwezigheid van eieren en vrouwtjes – die volgens Dun et al. (2017) zorgen voor meer eDNA – alsook aan de invloed van seizoenen (Harper et al., 2018).

Aanbevelingen

Het advies is om per meetlocatie meerdere eDNA-monsters te nemen. Uit kostenoverwegingen is ervoor gekozen om de eDNA-concentratie te meten in slechts een enkel samengesteld monster. Hoewel trends in de data dan aangetoond kunnen worden, blijkt uit eerder onderzoek naar grote modderkruiper dat een nauwkeuriger bepaling van de eDNA-concentratie (door twee of meerdere monsters te verzamelen) leidt tot een veel nauwkeuriger inschatting ($r^2 = 0,802$ bij negen monsters per sloot en zes tot twaalf qPCR-replica's) van de populatiedichtheid (De Jong & Van Bochove, 2016). Momenteel wordt ook gewerkt aan een methode om een monster van een nog groter volume te gebruiken om de betrouwbaarheid te verhogen. De aas-fuik-methode heeft als voordeel dat het een beeld geeft van de leeftijdsopbouw en de geslachtsverhoudingen van de populatie. Bij toepassing van de eDNA-methode blijft de populatieopbouw onbekend. Een advies is om onderzoek te verrichten naar factoren die variatie in eDNA-kwantiteit

beïnvloeden, zoals variatie in afbraaksnelheid van eDNA. Deze factoren zijn voornamelijk verschillend in waterdiepte, watertemperatuur, microbiële activiteit, mate van uv-instraling en seizoen. Ook variatie in verblijftijd van eDNA kan belangrijk zijn. Om een weloverwogen keuze te maken tussen de aas-fuik en eDNA-methode, is het advies om de kosten (materiaal en arbeid), praktische uitvoering (wel of geen vergunning nodig) en de meerwaarde van gegevens over de populatieopbouw tegen elkaar af te wegen. Nader onderzoek kan ook uitwijzen of eDNA een beter resultaat geeft in specifieke situaties, bijvoorbeeld relatief afgesloten gebieden (zoals in het onderzoek naar rijstvelden van Cai et al. (2017)).

Literatuur

Cai, W., Z. Ma, C. Yang, L. Wang, W. Wang, G. Zhao, Y. Geng & W.Y. Douglas, 2017. Using eDNA to detect the distribution and density of invasive crayfish in the Honghe-Hani rice terrace World Heritage site. *PLoS ONE* 12(5): e0177724.

Dun, N., V. Priestley, A. Herraiz, R. Arnold & V. Savolainen, 2017. Behavior and season affect crayfish detection and density interference using environmental DNA. *Ecology and evolution* 7: 777-7785.

Harper, K., P. Anucha, J. Turnbull, C.W. Bean, M. Leaver, 2018. Searching for signal: environmental DNA (eDNA) for the detection of invasive signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). *Management of Biological Invasions* 9: 137-148.

Hop, 2020. Bepalen inspanning kreeftenmonitoring. ATKb, Culemborg.

Jong, T.H. de & K. van Bochove, 2016. De Grote modderkruiper, lastig te vangen? *De Levende Natuur* 117 (02): 65-69.

Janssen, Y. & J. Kampen, 2020. Reductie van een populatie rode Amerikaanse rivierkreeften in de Distelvinkplas van de Molenpolder; deel 1 korte termijn effecten van 2018 en 2019 op de kreeftenpopulatie. ATKb, Culemborg.

Kanters, S., 2019. Absence of *Stratiotes aloides* L.: is vegetation destruction by *Procambarus clarkii* (girard) the key? Witteveen+Bos, Deventer.

Opel, K.L., D. Chung, & B.R. McCord, 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences* 55(1): 25-33.

Rusch, J.C., M. Mojžišová, D.A. Strand, J. Svobodová, T. Vrålstad & A. Petrusek, 2020. Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota* 58: 1-32.

Tangerman, M., E. Weerman, C. Cusell, A. van de Craats, L. Doef, M. Jans, D. Lammers, R.J. Breder-

veld, L. Moth, J. Kampen, R. van de Haterd & A.L.M. Kooijman, 2021. Beheer rode Amerikaanse rivierkreeften op basis van stuurfactoren. *De Levende Natuur* 122(4): 144-147.

Vrålstad, T., A.K. Knutsen, T. Tengs, A. Holst-Jensen, 2009. A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137: 146-155.

Witteveen+Bos, 2020a. Verklarende studie naar het voorkomen van rode Amerikaanse rivierkreeft in Nederland. Witteveen+Bos, Deventer.

Summary

Determining the density of the red swamp crayfish: capture or eDNA?

For management purposes it is crucial to know the density of red swamp crayfish in water systems. Currently the most popular method to obtain these numbers is with baited traps, but this method is labor intensive, requires permits, and is therefore costly. This study explores the use of eDNA as a substitute that is cheaper and requires no permits. Results show the method has potential but needs finetuning and some extra research to be a useful substitute for the bait-trap method.

Dankwoord

Financiering voor het onderdeel eDNA kwam uit het Innovatiefonds van het Hoogheemraadschap van Delfland. Financiering van de aas-fuik-methode is betaald door het Gebiedsakkkoord Oostelijke Vechtplassen, Waternet, STOWA, Hoogheemraadschap van Rijnland, Hoogheemraadschap van Delfland, Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard, Hoogheemraadschap Stichtse Rijnlanden, Wetterskip Fryslân, Waterschap de Dommel, Waterschap Rivierenland en de VBNE. Het veldwerk is uitgevoerd door Daan Lammers, Lucas Doef, Mitzi Jans en Michiel Tangerman.

Annelies van de Craats
Witteveen+Bos
annelies.van.de.craats@witteveenbos.com

Kees van Bochove
Datura
kees.vanbochove@datura.nl

Casper Cusell
Witteveen+Bos
casper.cusell@witteveenbos.com

Ernst Raaphorst
Hoogheemraadschap van Delfland
eraaphorst@hhdelfland.nl