



Universiteit
Leiden
The Netherlands

From molecules to monitoring: integrating genetic tools into freshwater quality assessments

Beentjes, K.K.

Citation

Beentjes, K. K. (2021, April 8). *From molecules to monitoring: integrating genetic tools into freshwater quality assessments*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3158798>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3158798>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3158798> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Beentjes, K.K.

Title: From molecules to monitoring: integrating genetic tools into freshwater quality assessments

Issue Date: 2021-04-08

SAMENVATTING

Zoetwater is een belangrijke hulpbron, niet alleen voor de ecosystemendiensten die het aan de mensheid levert, maar ook als een leefgebied voor veel planten- en diersoorten. Zoetwaterecosystemen lopen echter een groot risico op achteruitgang in soortendiversiteit als gevolg van verlies van leefgebieden, vervuiling en overexploitatie, en de introductie van invasieve soorten. De monitoring van zoetwaterkwaliteit wordt voorgeschreven door de Kaderrichtlijn Water (KRW), gebaseerd op Europese en nationale regelgeving. Kwaliteitsbeoordeling van zoetwater maakt gebruik van verschillende criteria die de gezondheidstoestand en impactstatus bepalen. De biologische elementen van deze beoordelingen zijn gericht op organismen die in zoetwatersystemen leven, zoals vissen, ongewervelden en planten. Traditionele beoordelingsmethoden zijn afhankelijk van arbeidsintensieve en daarmee dure methoden om organismen te verzamelen en te determineren. Recente ontwikkelingen in moleculaire technieken zorgen voor eenvoudigere determinatie via barcodes en soortdetectie met behulp van “environmental” DNA (eDNA).

Vergelijkend onderzoek waarbij zowel traditionele methodologie als op DNA gebaseerde analyses beoordeeld worden is belangrijk in de overgang naar moleculaire methoden voor beoordelingen van ecologische kwaliteitsratio's (EKR). Aangezien traditionele methoden zijn opgezet met kennis van de bestaande beperkingen, zijn op DNA gebaseerde technieken niet noodzakelijkerwijs in overeenstemming met de vereisten van de KRW. Een belangrijk twistpunt is het gebruik van gegevens over de abundanties van organismen bij het berekenen van EKR-scores. Methoden voor DNA metabarcoding zijn vatbaar voor processen die bepaalde reacties bevooroordeelen, waardoor de oorspronkelijke biomassa of het aantal individuen lastig te achterhalen is. In Hoofdstuk 2 onderzochten we de invloed van abundantiegegevens op de EKR-score volgens het Nederlandse EKR-berekeningssysteem. Door EKR-scores berekend met historische gegevens te vergelijken met EKR-berekeningen waarin de aantallen individuen waren verwijderd (en dus EKR's alleen berekend op basis van aan- en afwezigheid van soorten) ontdekten we dat abundantiegegevens slechts van beperkte invloed waren. De sterke correlatie tussen de scores met en zonder aantallen individuen zou het mogelijk maken om op DNA gebaseerde soortenlijsten te gebruiken voor KRW-beoordelingen, hetgeen de weg vrijmaakt voor de introductie van op DNA gebaseerde identificaties in routinematige kwaliteitsmonitoring.

Studies die traditionele op morfologie gebaseerde beoordelingen vergelijken met DNA en eDNA metabarcoding benadrukken ook verschillen die worden veroorzaakt door onderliggende problemen, zoals lastig te determineren taxa of incomplete determinatiesleutels, of het niet kunnen onderscheiden van soorten op basis van de gebruikte DNA-barcodes. Hoofdstuk 3 illustreert deze problemen, in een studie waarbij DNA metabarcoding en traditionele determinaties vergelijkbare aantallen taxa opleverden. Er waren echter grote verschillen tussen de taxalijsten van beide methoden, met minder dan 60% overlap tussen de twee. Eenvoudige taxonomische sortering van de monsters verlichtte enkele van de eerdergenoemde technische problemen, en onze resultaten laten duidelijk de effecten van preferentiële amplificatie in complexe bulkmonsters zien. Het effect van de verschillen tussen de soortenlijsten op de EKR-scores was aanzienlijk, maar DNA metabarcoding leverde meer informatie op voor taxonomische groepen die lastig zijn te determineren met morfologische kenmerken, zoals dansmuggen. Integratie van op DNA gebaseerde identificaties voor dergelijke groepen zou nauwkeurigere EKR-statusbeoordelingen mogelijk maken.

Naast de op DNA gebaseerde identificaties, is eDNA een methode die van grote invloed kan zijn op de praktijk van zoetwaterkwaliteitsbeoordelingen, omdat het eenvoudigere, goedkopere en makkelijker te standaardiseren bemonstering mogelijk maakt. Er zijn echter veel onbeantwoorde vragen over het gedrag—of de “ecologie”—van eDNA in het water. In Hoofdstuk 4 hebben we de impact van replica's in verschillende stappen van de analyse op inschattingen van soortenrijkdom en gemeenschapspatronen onderzocht. Hoewel het effect van PCR-replica's beperkt was, was het effect van het nemen van replica's tijdens de bemonstering van water aanzienlijk. De verschillen tussen replica's waren groot, wat de heterogene distributie van eDNA binnen een waterlichaam laat zien. Bovendien toonde een wekelijks bemonstering van dezelfde twee monsterlocaties aan dat replica's door de tijd meer van elkaar verschillen dan monsterreplica's genomen op één moment. Dit geeft aan dat de turnover van biodiversiteit een groter effect heeft op de samenstelling van het eDNA dan de ruimtelijke heterogeniteit. Veel studies nemen deze effecten echter niet mee in hun studieopzet, wat betekent dat vergelijkingen tussen locaties die niet op een gelijk tijdstip zijn bemonsterd waarschijnlijk te maken hebben met overschattingen van de verschillen in diversiteit tussen deze locaties.

Een van de belangrijkste problemen bij het gebruik van eDNA is dat het veel DNA-profielen (Molecular Operational Taxonomic Units ofwel MOTU's) kan opleveren die niet direct kunnen worden gekoppeld aan een bekende soort of taxon, vanwege onvolledige databases, maar ook vanwege onbeschreven diversiteit. eDNA leent zich echter nog steeds goed voor vergelijkend onderzoek tussen locaties, bijvoorbeeld

maatregel-effect studies. In Hoofdstuk 5 hebben we een impactanalyse uitgevoerd met eDNA, om de effecten van de neonicotinoïde insecticide thiacloprid en kunstmest te onderzoeken, twee van de belangrijkste landbouwstressoren op zoetwatersystemen. Met behulp van eDNA hebben we drie verschillende taxonomische groepen beoordeeld die drie trofische niveaus in het ecosysteem vertegenwoordigden: bacteriën (reducenten), fytoplankton (primaire producenten) en dansmuggen (consumenten en sleutelindicatoren). Dit experiment werd uitgevoerd in een uniek “Living Lab”, waarin een gecontroleerd experiment in een semi-natuurlijke omgeving mogelijk werd gemaakt. Het gebruik van een volledig factoriële proefopzet met replica's maakte het ook mogelijk om de effecten van stressoren afzonderlijk te beoordelen. Door het experiment gelijktijdig met een op morfologie gebaseerde beoordeling van dezelfde opzet uit te voeren, konden we de DNA resultaten eveneens rechtstreeks vergelijken met traditionele methoden. Voor alle drie de onderzochte groepen werden door de tijd heen vergelijkbare patronen waargenomen voor beide stressfactoren, wat suggereert dat de onderzochte landbouwstressoren het gehele voedselweb beïnvloeden, hetzij direct, hetzij via cascadereducties. De patronen waren daarnaast ook consistent met morfologische beoordelingen, zelfs met een lager aantal replica monsters. Dit toont aan dat het gebruik van dit soort eDNA methoden op meerdere trofische niveaus een uitgebreidere beoordeling geeft van de impact van stressfactoren op een ecosysteem als geheel, met een hogere taxonomische resolutie dan traditionele onderzoeken. We vonden een groot aantal mogelijke nieuwe bio-indicatoren voor landbouwstress, in de vorm van meer dan duizend DNA-profielen die indicatief bleken voor de aan- of afwezigheid van de stressoren.

Er zijn nog tal van onbeantwoorde vragen omtrent de toepassing van aquatische DNA-methoden. Niet alleen over hoe DNA-gegevens moeten worden vertaald naar traditionele taxa, maar ook over de optimalisatie van bemonsteringsstrategieën en de gedragingen van eDNA in het water. Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd laat echter, samen met een almaar toenemend aantal publicaties over vergelijkbare onderwerpen, zien dat op DNA gebaseerde methoden een groot potentieel hebben voor monitoring van zoetwaterkwaliteit en effectbeoordelingen in dergelijke systemen. De toepassing van deze technieken zal bijdragen aan een beter begrip van ecosystemen, en effectievere monitoring en beheer van zoetwatersystemen waarbij we duurzaam gebruik kunnen blijven maken van ecosystemendiensten. Voor een succesvolle integratie in ecosysteembeoordelingen is het ook belangrijk om waterbeheerders en beleidsmakers bij deze omschakeling te betrekken, door de mogelijkheden van op DNA gebaseerde methoden te demonstreren en hen te betrekken bij de ontwikkeling van nieuwe monitoringstechnieken.