

Met eDNA de mythische Grote modderkruiper op het spoor

Rein Brys, David Halfmaerten, Sabrina Neyrinck, Joachim Mergeay & Claude Belpaire

De Grote modderkruiper is een vissoort van stilstaande wateren en traagstromende beken. Ze is de laatste decennia dramatisch achteruitgegaan. Zo sterk zelfs dat men ervoor vreest dat de soort zich in Vlaanderen mogelijk op de rand van uitsterven bevindt. Haar erg mysterieuze nachtelijke levenswijze maakt het erg moeilijk deze vis waar te nemen, wat een accurate inschatting van het voorkomen van deze Habitatrichtlijnsoort sterk belemmert. Via het oppikken van DNA-sporen die de soort in haar omgeving achterlaat (zogenaamd eDNA), tonen we in deze bijdrage aan dat de Grote modderkruiper toch nog op meer plaatsen aanwezig is dan aanvankelijk gedacht. We bespreken ook de mogelijkheden van de ontwikkelde eDNA-techniek voor het opsporen van andere soorten.

Biologie van de soort

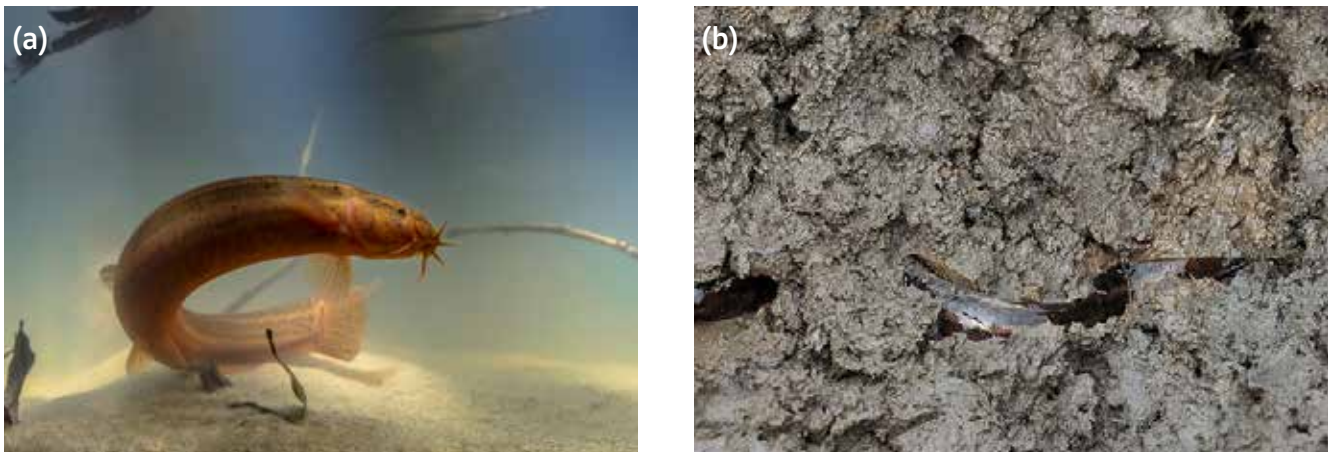
De Grote modderkruiper *Misgurnus fossilis* is een substraatbewonende vissoort die binnen Europa een vrij groot verspreidingsgebied heeft (Lelek 1987) (**Figuur 1**). Het is een habitat-specialist die zich voornamelijk ophoudt in laagdynamische en vegetatierijke en modderige wateren (Schouten 1992). De soort wordt voornamelijk aangetroffen in oude rivierbeddingen en in mindere mate in bovenstroomse regio's van waterlopen. Het is een vissoort die een breed spectrum aan biotopen kan bewonen, zoals vijvers, ontginningsputten, oude rivierarmen, afwateringsgreppels, poldersloten, drinkpoelen, vloeiveiden en overstromingsgebieden van rivieren (Schouten 1992, De Nie 1996).

De Grote modderkruiper is een nachtactieve soort, die zich overdag schuilhoudt in de vegetatie of de modder van waterpartijen. Het is een langgerekte cilindervormige vis die circa 30 cm groot kan worden. Zijn ogen zijn klein, maar met zijn baarddraden vindt hij zijn weg in het donker en speurt hij naar voedsel (**Figuur 2a**). De rug is bruin tot roodbruin en op de flanken lopen twee gele tot goudgele banden in de lengterichting, die vooral schitteren in het voortplantingsseizoen en bij jonge dieren. De buik is gelig en de vinnen zijn afgerond, hoewel de borstvinnen van de mannetjes groter en puntiger zijn. Door de grootte en kleurtekening is de soort gemakkelijk te onderscheiden van de nauw verwante Kleine modderkruiper. Zijn Latijnse naam *Misgurnus fossilis* heeft hij te danken aan zijn voorkomen in de modder (fossa: gracht, fossilis: opgegraven) en een reeks opmerkelijke aanpassingen, zoals darmademhaling en de aanwezigheid van uitwendige kieuwen in het larvaal stadium (Käfel 1991, Grieb 1937). Daardoor kan de soort extreem zuurstofarme situaties vlot overleven (Holcik 1989, Svobodová et al. 1993). Deze aanpassing geeft hem een competitief voordeel

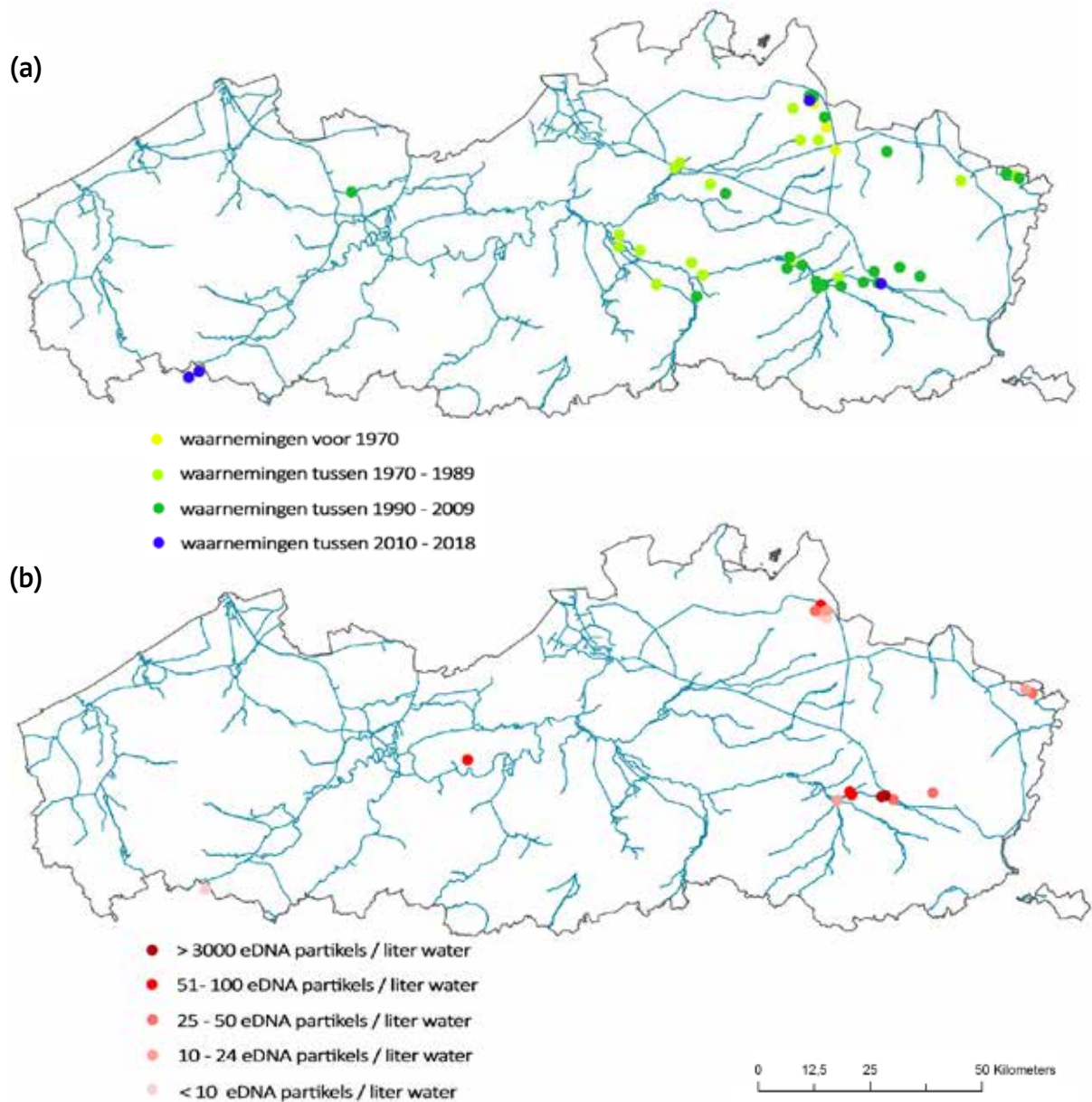
in waterpartijen die 's zomers te maken krijgen met nachtelijke zuurstoftekorten in de waterkolom, bijvoorbeeld door algenbloei of door massale aanwezigheid van waterplanten. Naast gewone kieuwademhaling maakt de soort bijkomend gebruik van een gedeeltelijke huid- en maag-darmademhaling (Schouten 1992). Ook bij het compleet droogvallen van zijn leefgebied heeft hij een passende overlevingsstrategie door zich in de modder in te graven en zich te omhullen met een slijmcocon die verdere uitdroging van zijn lichaam voorkomt (**Figuur 2b**).



Figuur 1. Het verspreidingsgebied van de Grote modderkruiper *Misgurnus fossilis* (gebaseerd op Lelek 1987).



Figuur 2. Grote modderkruiper (a) zwemmend in de waterkolom (© Rudmer Zwerver) en (b) ingegraven in de modder van een uitgedroogde sloot. (© Josef Lubomir Hlasek).



Figuur 3. (a) Verspreidingskaart van alle gedocumenteerde historische observaties van Grote modderkruiper in Vlaanderen, in vergelijking met (b) de geselecteerde locaties waar in 2018 gericht naar Grote modderkruiper werd gezocht en de soort via eDNA werd aangetroffen. De kleuren geven een maat voor de hoeveelheid (aantal eDNA-partikels per liter water) eDNA-sporen die werden aangetroffen.

Tijdens deze periode gaan de dieren in een 'droogteslaap', waarbij de metabolische functies tot een minimum worden beperkt en het zuurstofverbruik enorm vermindert. Zo kunnen individuen verschillende maanden tot zelfs een jaar in de modder overbruggen (Philippart & Vranken 1981, Raveret-Wattel 1990). Deze kenmerken maken dat de Grote modderkruiper een enorm voordeel heeft ten opzichte van andere vissoorten en een niche kan bezetten die in onze wateren door geen enkele andere inheemse vissoort kan worden ingenomen.

Ondanks het vermogen om in extreme condities te overleven, is de Grote modderkruiper wel sterk afhankelijk van het voorkomen van overstromings- en plas-dras situaties. In het voorjaar trekken volwassen dieren namelijk naar dit soort leefgebieden om er te paaien en hun eitjes in ondiepe en snel opwarmende waterpartijen af te zetten (Meyer & Hinrichs 2000, De Bruin & Kranenbarg 2015). Een hoge watertemperatuur is noodzakelijk om de eitjes optimaal en snel te laten ontwikkelen (Drozd et al. 2009). Doordat aquatische predatoren in deze tijdelijke en ondiepe wateren veel minder aanwezig zijn, loopt de Grote modderkruiper veel minder risico om tijdens de eerste levensstadia opgegeten te worden (Bohl 1993). Wanneer tegen de zomer deze ondiepe plassen geleidelijk droogvallen, zwemmen de juveniele dieren met het aflopende water mee op zoek naar dieper, laag dynamisch en vegetatierijk water om zich daar verder te ontwikkelen. Juveniele Grote modderkruipers zijn gevoelig aan extreme of snelle uitdroging van de paaigebieden, omdat ze een welbepaalde grootte nodig hebben om mee met het wegtrekkende water te kunnen migreren. De soort heeft een enorm groeipotentieel in het eerste levensjaar, waarin ze reeds een derde van haar totale grootte bereikt. Na twee jaar worden Grote modderkruipers doorgaans geslachtsrijp. Het ideale leefgebied om duurzame populaties te herbergen zijn overstromingsvlakten die een afwisselend regime vertonen van natte voorjaren (met goede reproductiemogelijkheden) en droge zomers (met aanzienlijke uitdunning van predatoren en competitoren). Het frequent overstromen van zijn leefgebied biedt de Grote modderkruiper ook de mogelijkheid om nieuwe geschikte wateren te koloniseren.

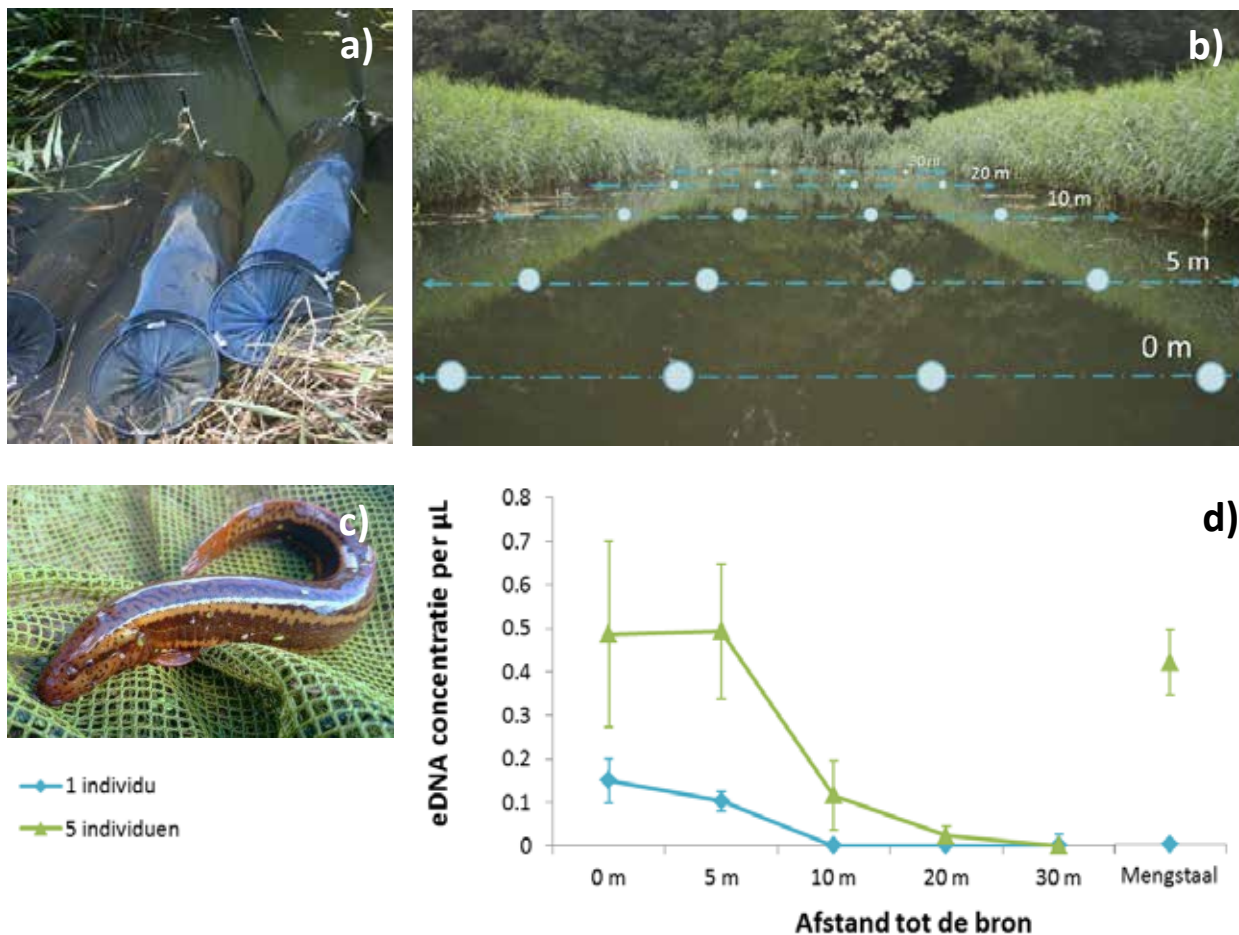
Dramatische achteruitgang

In de 19de eeuw was de Grote modderkruiper in Vlaanderen een veelvoorkomende soort, aangezien de nodige habitatcondities veel voorkwamen in de bekkens van bijvoorbeeld de Leie, Dijle, Demer en de Nete (**Figuur 3a**). Door de graduele inpoldering van de meeste rivier- en beekuitwaarden verdween de hydrodynamiek echter in veel van deze systemen en begon het landschap en landgebruik door toedoen van de mens drastisch te veranderen. Initieel resulteerden deze veranderingen niet onmiddellijk in een acute bedreiging voor de soort, omdat de poldersloten die in de plaats kwamen in veel gevallen een prima vervanghabitat vormden. Hierin speelde het extensieve onderhoud van de sloten een gunstige rol in het tegengaan van een al te drastische verlanding. Op het einde van de 19de en begin 20ste eeuw was de Grote modderkruiper nog een welgekende soort bij landbouwers, waarbij de soort in de volksmond vaak als 'weeraal' of 'aalpieper' werd aangeduid. Verdere intensifiëring van de landbouwgronden en het opkomen van waterhuishouding- en ontwateringssystemen heeft vanaf half vorige eeuw gezorgd voor een graduele, drastische achteruitgang van de soort. Hierbij vormt het verloren gaan van geschikte plaatsen om zich voort te planten een van de grootste bedreigingen. Daarnaast wordt vermoed dat het gebruik van pesticiden een nefaste invloed heeft op de Grote modderkruiper, aangezien soorten uit het geslacht *Misgurnus* erg gevoelig zijn aan hormoonverstorende stoffen (Belpaire & Coeck 2016).

Niet enkel optimalisatie van het waterpeilbeheer heeft het geschikte habitat drastisch doen inkrimpen, ook de toemende ruilverkavelingen en intensifiëring van het slootonderhoud hebben de soort verder teruggedrongen, waardoor de Grote modderkruiper in Vlaanderen grotendeels verdween. Het verdwijnen van voorjaarshoogwater in combinatie met het ontstaan van barrières maakt ook dat kolonisatie van geschikte sloten en moerasgebieden niet langer mogelijk is. Dit resulteert bijkomend in een genetische verarming van de resterende populaties die zich her en der nog in het landschap ophouden. Hieraan gekoppeld staan deze restpopulaties bloot aan graduele



Figuur 4. Traditionele vismethoden via (a) elektrisch vissen en (b) het uitzetten van fuiken om de aanwezigheid van Grote modderkruiper te bepalen. (© David Halfmaerten)



Figuur 5. Opzet van het experiment in een kweekvijver te Linkebeek, waarbij een week na het inbrengen van de modderkruipers in leefnetten (a) op een vast punt in de vijver, op verschillende afstanden hiervan waterstalen werden genomen voor eDNA (b). Voor dit experiment werden Aziatische modderkruipers *Misgurnus anguillicaudatus* gebruikt omdat deze wat hun morfologie en gedrag betreft sterk gelijkend zijn op Grote modderkruiper (c). In de grafiek (d) wordt de sterkte van het eDNA-signaal weergegeven dat werd opgepikt op verschillende afstanden van de leefnetten waarin de modderkruiper zich bevond. (© Rein Brys)

verliezen van adulte vitale dieren doordat ze in hun zoektocht naar geschikte paaigebieden vaak stroomafwaarts migreren, maar door barrières zoals stuwen en gemalen niet in staat zijn terug naar hun plaats van herkomst te zwemmen.

Dit alles maakt dat de Grote modderkruiper momenteel veel zeldzamer is dan men uit oude referenties en observaties (De Vocht & Gaethofs 2002, Vrielynck et al. 2003) zou opmaken. De dramatische achteruitgang van de Grote modderkruiper wordt pijnlijk duidelijk wanneer we naar het aantal gedocumenteerde veldobservaties kijken die in Vlaanderen van de soort voor handen zijn (Belpaire & Coeck 2006, Vis InformatieSysteem <http://vis.inbo.be>, **Figuur 3a**). Hieruit blijkt dat de waarnemingen (afkomstig van gerichte afvissingen en toevallige bijvangsten) sinds 1970 enorm zijn teruggevallen (**Figuur 4**). De soort is zo zeldzaam geworden dat ze de laatste tien jaar nog maar op drie locaties via visbestandsopnames werd waargenomen. Wetende dat de inspanningen en aandacht om de resterende populaties van Grote modderkruiper in kaart te brengen de laatste decennia enkel zijn toegenomen, is zijn werkelijke afname allicht nog dramatischer dan het dalende aantal observaties doet vermoeden. Dit maakt dan ook dat de soort is ingedeeld in de Rode Lijstcategorie kritisch bedreigd (CR of

Critically Endangered, Vandelannoote et al. 1998, Verreycken et al. 2013). Aansluitend is de soort door de wet op de riviervisserij en het Soortenbesluit in Vlaanderen volledig beschermd. Ook buiten Vlaanderen gaat de Grote modderkruiper er enorm op achteruit, waarbij de achteruitgang het sterkst is in Noordwest-Europa. In Frankrijk komt de soort in het noorden nog plaatselijk voor, maar in Denemarken zijn nog slechts een paar vindplaatsen gekend, met telkens slechts enkele individuen (Raveret-Wattel 1900, Keith & Allardi 2001). Nederland wordt momenteel aanzien als een van de belangrijkste gebieden voor Grote modderkruiper, hoewel men er ook daar van uitgaat dat de resterende populaties nog slechts een fractie vertegenwoordigen van wat het ooit moet zijn geweest en de soort nog zelden in grote aantallen lijkt voor te komen (Nijssen & De Groot 1987, Liefvering & Meire 2003). Enkel in Centraal- en Oost-Europa zouden de populaties stabielere zijn (Lelek 1987). Dit alles maakt dat de Grote modderkruiper op Europees niveau beschermd wordt door de conventie van Bern (opgenomen in Bijlage III) en de Habitatrichtlijn (opgenomen in bijlage II). Wil men de soort, die zich bij ons duidelijk op de rand van uitsterven bevindt, op een efficiënte manier kunnen beschermen, dan moet in eerste instantie een betrouwbaar overzicht worden bekomen van de resterende populaties. Tevens is

deze informatie cruciaal voor het ontwikkelen en toepassen van soortherstelprogramma's zoals kweek en herintroductie (Belpaire et al. 2016, Auwerx et al. 2018). Gezien het verborgen karakter van deze soort is het in beeld brengen van de huidige populaties een enorm moeilijke uitdaging, waartoe we met dit onderzoek een bijdrage wilden leveren.

Kan eDNA-onderzoek helpen?

Omdat vissen en veel amfibieën gevangen moeten worden om hun aanwezigheid en dichtheden accuraat te kunnen inschatten, vergt het grote inspanningen om na te gaan waar ze zich in het landschap ophouden. Hun populaties verder opvolgen is dus zeker geen evidentie. Naast het feit dat dit alles erg arbeidsintensief is, kan het ook een versturende impact hebben op het habitat en de populaties die worden onderzocht. Daarbij komt dat de pakkans voor soorten die een erg verdoken bestaan leiden vaak erg beperkt is, waardoor het erg moeilijk en bovendien enorm arbeidsintensief is om een betrouwbare inschatting van hun aanwezigheid te bekomen. Met de ontwikkeling van de techniek van eDNA-barcoding verwacht men dat de monitoring van veel aquatische soorten op termijn veel efficiënter zal kunnen worden uitgevoerd. De methode is erop gericht om DNA-sporen die organismen in hun omgeving achterlaten (via bv. faeces, slijm en bloed) op te pikken en te detecteren (zie vroegere bijdrage rond eDNA in dit tijdschrift, Brys et al. 2016). Dit verklaart ook de term eDNA, afkomstig van environmental of omgevings-DNA. De sterkte van deze methode zit hem erin dat ze enorm gevoelig is en in staat om extreem lage concentraties van deze DNA-partikels uit de omgeving te detecteren. Dit gebeurt via een meerstapsproces waarbij eerst de eDNA-moleculen via fijngevoelige filtersystemen worden verzameld en geïsoleerd. In een volgende stap wordt het verzamelde eDNA vermeerderd (amplificatie in een polymerasekettingreactie of PCR, Bohmann et al. 2014). Zo worden voldoende hoge concentraties van het (e)DNA bekomen, waarmee op een betrouwbare manier de aanwezigheid van een of meerdere soorten kan worden bepaald.

Op het INBO wordt sinds enkele jaren intensief onderzoek uitgevoerd om deze methode toepasbaar te maken voor de detectie van zeldzame en invasieve vis- en amfibiesoorten en de monitoring van hun volledige gemeenschappen in functie van bijvoorbeeld de Kaderrichtlijn Water. Enkele soorten die hierbij in een eerste fase onder de loep werden genomen zijn de Grote modderkruiper, Kamsalamander, Vroedmeesterpad en Knoflookpad. De methode wordt ook ingezet voor de detectie van een aantal invasieve aquatische soorten zoals Stierkikker en Ponto-Kaspische grondels en om beschermings- en bestrijdingsprogramma's bijkomend te ondersteunen. Recente verfijning van de methodiek stelt ons in staat om zelfs in extreem troebel water nauwkeurig aan detectie te doen. Deze techniek kan ook het aantal DNA-moleculen per liter water zeer nauwkeurig bepalen, wat de mogelijkheid schept om inschattingen rond dichtheden van de doelsoort te bekomen. Via de ontwikkeling van een nieuw en erg gevoelig detectieprotocol voor Grote modderkruiper werd via deze methode een groot aantal locaties in Vlaanderen onderzocht op de mogelijke aanwezigheid van deze soort.

Hoe gevoelig is de eDNA-methodiek?

Om de gevoeligheid van de ontwikkelde methode voor Grote modderkruiper onder natuurlijke maar gecontroleerde condities te testen, werd in eerste instantie een experiment opgezet om na te gaan over welke afstand we in staat zijn de aanwezigheid van de vissen op te pikken (**Figuur 5a-d**). Hiervoor werden modderkruipers in een vijver met natuurlijk visbestand in twee verschillende dichtheden (één individu versus vijf individuen) in een leefnet uitgezet. Na een week werd een staalname uitgevoerd op verschillende afstanden van dit leefnet (0, 5, 10, 20 en 30 meter). Omdat de Grote modderkruiper zo extreem zeldzaam is, werd ervoor gekozen met Aziatische modderkruipers te werken. Deze zijn qua grootte en gedrag zeer gelijkend op onze inheemse Grote modderkruipers en zijn een perfecte soort om de gevoeligheid van de methode te toetsen. In het eerste deel van het experiment werd één modderkruiper in het leefnet gezet. Na een week werd het water bemonsterd en werd het experiment herhaald met vijf individuen.

De resultaten tonen duidelijk dat het eDNA dat de modderkruipers afscheiden erg lokaal blijft hangen in stilstaand water. Bij een dichtheid van slechts één individu, blijken we enkel in staat om de soort op te pikken bij stalen die worden genomen tot op een afstand van 5 meter van het leefnet. Bij een dichtheid van vijf individuen blijkt het eDNA-signaal niet enkel sterker te worden, maar is het ook tot op een afstand van 20 meter in de waterkolom detecteerbaar (**Figuur 5d**). De sterkte van het signaal geeft m.a.w. ook een ruwe inschatting van de dichtheid van de aanwezige doelsoort. Verder blijkt dat het nemen van een mengstaal, bestaande uit een reeks (sub-) stalen genomen over heel de vijver, een efficiënte manier is om de aanwezigheid van modderkruiper in een waterpartij op te sporen. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat de detectieresolutie vermindert naarmate het aantal individuen afneemt of naarmate de te onderzoeken waterpartij groter wordt, aangezien de kans op detectie dan door verdunnings-effecten vermindert. Tot slot bleek uit het experiment dat één week nadat de modderkruipers uit de vijver werden gehaald geen enkel eDNA-spoor meer kon worden opgepikt. Dit is te wijten aan het feit dat eDNA door uv-straling of microbiële activiteit erg snel wordt afgebroken. Dit toont dus dat op basis van eDNA een betrouwbare inschatting kan worden gemaakt van de effectieve huidige aanwezigheid van een soort in een systeem. Het spreekt voor zich dat de techniek het best wordt toegepast op momenten dat de soort in de waterkolom het meest actief is en heeft echter ook als nadeel dat wanneer modderkruipers om een of andere reden beslissen zich gezamenlijk te verschuilen in de modder, we ze via deze methode niet of nauwelijks meer kunnen detecteren.

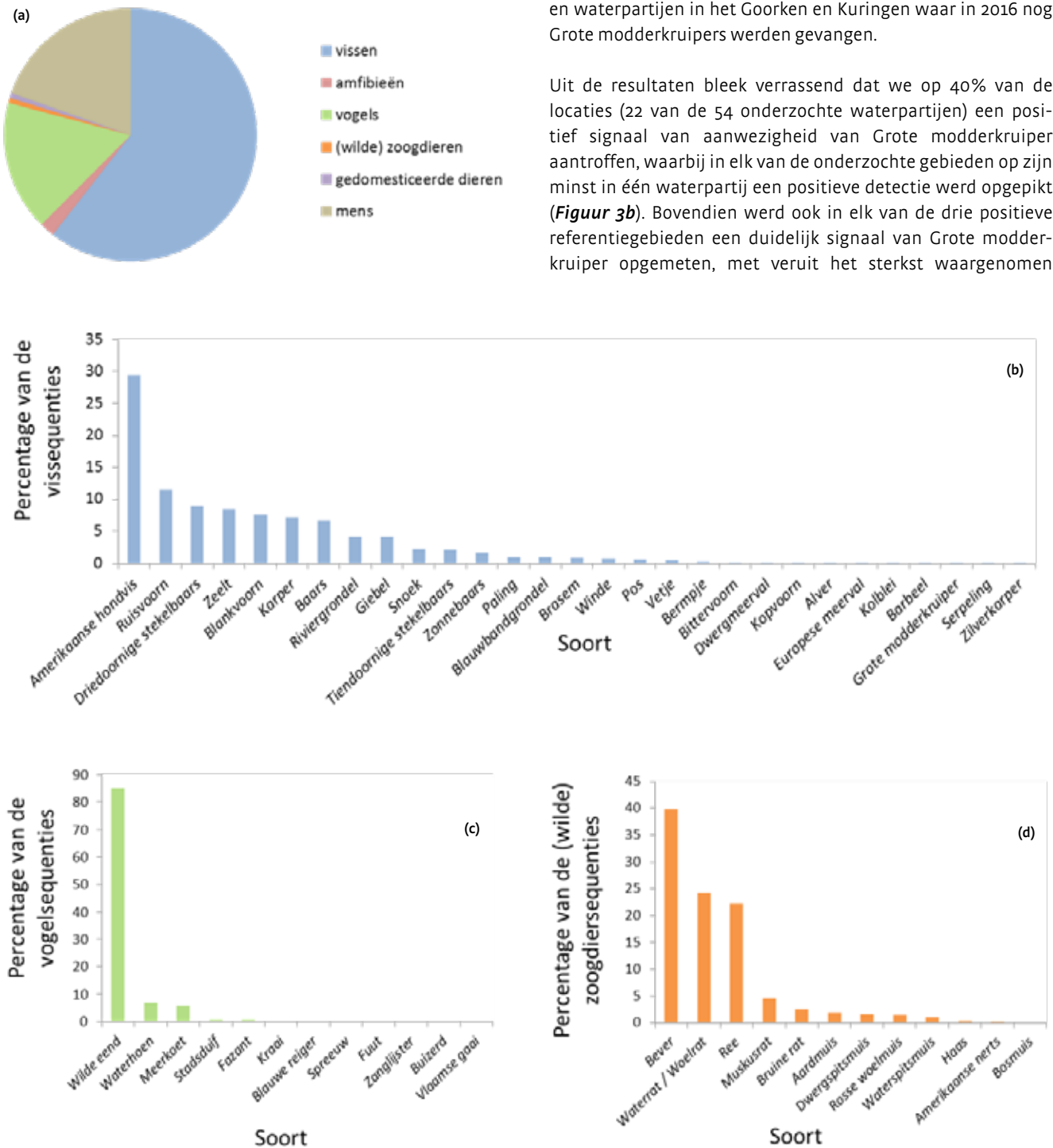
Screening van potentiële gebieden in Vlaanderen

Op basis van historische observaties en recente vangsten van Grote modderkruiper werd bij aanvang van het onderzoek een lijst opgesteld van een 50-tal locaties waar de soort in het verleden werd aangetroffen maar sinds lang niet meer is gezien, of locaties waarvan vermoed wordt dat ze geschikt

zouden kunnen zijn maar waar de soort nooit is waargenomen. De bemonsterde locaties liggen in de volgende gebieden: Schulensbroek (Herk-de-Stad), Webbekoms Broek (Diest), Herkenrode, 't Prinsenhof (Hasselt) en vijvers van het Wik (Bokrijk) in het Demerbekken, Kempenbroek (Kinrooi), het Goorken (Arendonk), Berlarebroek en Donkmeer (Berlare) en tot slot drie locaties in Noord-Frankrijk. Binnen elk van de

gebieden werden een aantal locaties geselecteerd, waar eind juni – begin juli het water werd onderzocht op de aanwezigheid van eDNA van Grote modderkruiper. Een groot deel van de stalen die in het Schulensbroek en Webbekoms Broek werden genomen, werden in opdracht van een lopend Life-project (Life DELTA) bemonsterd, in nauwe samenwerking met Regionaal Landschap Haspengouw en Voeren en Natuurpunt. Als positieve referentie werden drie locaties opgenomen waar de soort recent werd gevangen. Het betrof hier een locatie in Herkenrode waar in 2018 een 25-tal individuen werd opgevisst en waterpartijen in het Goorken en Kuringen waar in 2016 nog Grote modderkruipers werden gevangen.

Uit de resultaten bleek verrassend dat we op 40% van de locaties (22 van de 54 onderzochte waterpartijen) een positief signaal van aanwezigheid van Grote modderkruiper aantreffen, waarbij in elk van de onderzochte gebieden op zijn minst in één waterpartij een positieve detectie werd opgepikt (**Figuur 3b**). Bovendien werd ook in elk van de drie positieve referentiegebieden een duidelijk signaal van Grote modderkruiper opgemeten, met veruit het sterkst waargenomen



Figuur 6. (a) proportioneel aandeel eDNA-fragmenten behorend tot verschillende taxonomische groepen t.o.v. het totaal aantal opgepikte eDNA-fragmenten, met bijkomende opsplitsing op soortniveau voor respectievelijk: vissen (b), vogels (c) en zoogdieren (d). De resultaten zijn het gemiddelde van tien verschillende locaties die in deze studie werden onderzocht.



Figuur 7. Drie voorbeelden van opmerkelijke zoogdieren die in de eDNA-extracten van enkele van de onderzochte waterstalen werden aangetroffen: (a) Woelrat of Waterrat, (b) Waterspitsmuis en (c) Bever. (© Vilda/Yves Adams en Rollin Verlinde)



eDNA staalname in kader van onderzoek naar Grote modderkruiper in een sloot in Webbekombroek. (© Rein Brys)

signaal in de twee sloten in Herkenrode waar enkele weken voordien nog 25 individuen werden afgevist (**Figuur 3b**). Zowel in het Goorken als het Schulensbroek werd in respectievelijk vijf en zeven waterpartijen DNA van de Grote modderkruiper opgepikt. Een erg opmerkelijke waarneming is de positieve detectie in een vijver nabij het Donkmeer in Berlare. Hier was de aanwezigheid van de soort voordien niet officieel gekend, maar uit meerdere zichtwaarnemingen was er wel het vermoeden dat Grote modderkruiper zich er ergens zou kunnen verschuilen (Belpaire & Coeck 2006, Van Liefvering & Audenaert pers. mededeling). Uit onze resultaten blijkt dat Grote modderkruiper zich er zeker ophoudt. Op veel van deze locaties waar we via eDNA een huidige aanwezigheid van Grote modderkruiper kunnen aantonen, is de afgelopen jaren via elektrische afvissingen of het gebruik van fuiken vaak vruchteloos gezocht naar de aanwezigheid van de soort. Dit geeft aan dat deze methode uitermate geschikt is om op een nauwkeurigere manier zeldzame of moeilijk waarneembare soorten op te sporen. We willen er hier ook op wijzen dat deze resultaten geenszins suggereren dat de soort er recent terug op vooruit zou zijn gegaan, of dat de afname minder dramatisch zou zijn dan gedacht. Doordat de soort zo moeilijk te vangen is, zijn historische waarnemingen die voorhanden zijn waarschijnlijk steeds een onderschatting geweest van de werkelijke aanwezigheid en verspreiding, maar is de soort er ongetwijfeld de laatste decennia dramatisch op achteruit gegaan.



Grote modderkruiper. (© Vilda/Rollin Verlinde)

Bijkomende toepassingsmogelijkheden van de techniek

Naast de enorme winst in efficiëntie die kan worden gemaakt bij de opsporing van één doelsoort (eDNA barcoding), kunnen via andere toepassingen van de techniek volledige soortengemeenschappen in kaart worden gebracht (eDNA metabarcoding) (Taberlet et al. 2012, Yinqiu et al. 2013, Bohmann et al. 2014). Een kanttekening die hierbij wel moet gemaakt worden is dat de detectieresolutie van eDNA metabarcoding lager is dan de soortspecifieke methode (zoals gebruikt in ons onderzoek naar Grote modderkruiper), waardoor ze minder geschikt is wanneer men één welbepaalde zeldzame soort wil opsporen.

Toepassing van eDNA metabarcoding op een reeks eDNA-stalen afkomstig van het onderzoek illustreert mooi hoe we op die manier de volledige visgemeenschap in de waterpartijen in kaart kunnen brengen en eveneens de aanwezigheid van amfibieën, vogels en zelfs zoogdieren in de nabije omgeving kunnen detecteren (Riaz et al. 2011, Kelly et al. 2014, **Figuur 6a**). Op basis hiervan kunnen bijvoorbeeld bijkomende inzichten worden bekomen of een locatie of leefgebied wat betreft de soortensamenstelling van geassocieerde vissoorten al dan niet geschikt zou kunnen zijn voor Grote modderkruiper (**Figuur 6b**). Zo is bijvoorbeeld geweten dat de soort erg te

lijden heeft als roofvissen zoals de Snoek in hoge dichtheden voorkomen. Van de Karper vermoedt men dat hij door zijn versturende invloed op de bodem en vegetatie van aquatische systemen ook een nefaste invloed kan hebben op Grote modderkruiper. Naast het eDNA van verschillende watervogels dat we eveneens frequent oppikten (**Figuur 6c**), bleken ook sporen van verschillende zangvogels en zelfs roofvogels in het water aanwezig te zijn. Daarnaast werd ook DNA opgepikt van heel wat zoogdieren die op een of andere manier met het water in aanraking zijn gekomen, zoals de opmerkelijke bevindingen van de aanwezigheid van Amerikaanse nerts, de zeldzame Waterspitsmuis en Woelrat, maar ook de vaker voorkomende Bever en Muskrat (**Figuur 6d**, **Figuur 7**). Ook van soorten waarvan een minder sterke associatie met water wordt verwacht, zoals Ree, Haas, Rosse woelmuis, Aardmuis, Bosmuis en Dwergspitsmuis werden duidelijke sporen in de betreffende waterstalen opgepikt. Dit alles maakt duidelijk dat de eDNA-methode op termijn ook heel wat potenties heeft voor de monitoring van andere soorten en soortengroepen die via traditionele methoden moeilijk in kaart te brengen zijn (Deiner et al. 2017).

Conclusie

De resultaten van dit onderzoek illustreren duidelijk de kracht en inzetbaarheid van soortspecifieke eDNA testen (eDNA barcoding) voor het opsporen van aquatische soorten. De methode staat meer dan op punt om op een veel grotere schaal te worden ingezet voor de monitoring van zeldzame of nog weinig voorkomende soorten. Op deze manier kunnen resterende of koloniserende populaties relatief vlot en gebiedsdekkend in kaart worden gebracht en kan op termijn de impact van beheer- en beleidsingrepen worden opgevolgd. Anderzijds tonen de resultaten van de eDNA metabarcoding de sterkte van deze toepassing om volledige soortengroepen en gemeenschappen in kaart te brengen, wat enorme voordelen biedt in het kader van bijvoorbeeld biodiversiteitsonderzoek. Ook voor de vroegtijdige opsporing van invasieve, niet verwachte soorten is deze methode erg geschikt en kan ze enorme voordelen bieden voor een efficiënte bestrijding en gerichte bescherming van gebieden en gemeenschappen. Dit geldt niet enkel voor aquatische soorten, maar ook voor soorten die zich in en rond het water ophouden. Via deze methode kan in theorie zelfs de impact van de mens op een aquatisch systeem worden onderzocht door te kijken naar het aandeel eDNA dat afkomstig is van de mens zelf of aan de mens verbonden soorten, zoals koeien, varkens en kippen (**Figuur 6a**). Tot slot is het echter ook belangrijk de beperkingen van de methode steeds voor ogen te blijven houden, zoals de moeilijkheid om inzichten rond dichtheden of demografische structuur van populaties te bekomen. Dit maakt dat de sterkte van deze methoden helemaal tot zijn recht komt in complementariteit met traditionele monitoringstechnieken.

SUMMARY

Brys R., Halfmaerten D., Neyrinck S., Mergeay J. & Belpaire C. 2019. Environmental DNA based monitoring of the near-extinct European Weather Loach in Flanders. *Natuur.focus* 18(2): 51-59 [in Dutch]

The European Weather Loach *Misgurnus fossilis*, a typical species of lentic waterbodies such as backwaters, swamps and periodically flooded pools and meadows, is in dramatic decline and of international concern across its range. Also in Flanders the species is expected to balance at the brink of extinction and during the last decade only three observations of the species have been documented. Therefore efficient monitoring is essential if conservation efforts are to be successful, but due to the species' cryptic biology traditional monitoring methods are inefficient, time consuming and likely prone to non-detection error. Here we investigate the potential of environmental DNA (eDNA) monitoring as an alternative or supplementary method. In 2018 more than 50 locations where screened in Flanders and in 40% of the sites we successfully detected populations of the weather loach. The obtained results confirm that eDNA monitoring is a valid addition to traditional monitoring methods to monitor rare freshwater fishes and amphibians. We propose that, because of its lower cost and limited effort, eDNA approaches will provide an increased efficiency of management efforts for endangered or invasive freshwater species.

DANKWOORD

We zijn Joke Rymen, Jan Ruymen, Perrine Back en Elodie Fauconnet erg erkentelijk voor hun ondersteuning bij de veldcampagne in respectievelijk het Schulensbroek, Webbekoms Broek en Noord-Frankrijk. Ook Johan Auwerx willen we graag danken voor de praktische hulp en toezicht die we kregen bij de experimenten in Linkebeek en Quentin Mauvisseau voor zijn assistentie bij de ontwikkeling en aftoetsing van het nieuwe primer/probe assay voor detectie van Grote modderkruiper. Tot slot zijn we ook Leen Verschaeve, Tom Ruttink, Annelies Haegeman en Ariane Staelens erg dankbaar voor hun bijdragen aan het deel van de metabarcoding-analyses.

AUTEURS

Rein Brys en Joachim Mergeay zijn beide senior onderzoekers binnen het team Genetische Diversiteit van het INBO en Claude Belpaire is senior onderzoeker binnen het team Monitoring en herstel aquatische fauna. Sabrina Neyrinck en David Halfmaerten zijn beide onderzoeksmedewerkers binnen hetzelfde team Genetische Diversiteit.

CONTACT

Rein Brys, Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen.

E-mail: rein.brys@inbo.be

REFERENTIES

Auwerx J., Mergeay J. & Belpaire C. 2018. Haalbaarheidsstudie herintroductie Grote modderkruiper - Luik 3 Kweek. Haalbaarheid van de opkweek en herintroductie van de Grote modderkruiper in Vlaanderen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 67. D/2018/3241/189.

Belpaire C. & Coeck J. 2016. Haalbaarheidsstudie herintroductie Grote modderkruiper - Luik 1a. Habitatieisen. Literatuurstudie naar habitatieisen. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.R.2016.11407313.

Belpaire C., De Bruyn A., Galle L., Halfmaerten D., Lambrechts I., Maes Y. et al. 2016. Haalbaarheidsstudie herintroductie Grote modderkruiper - Luik 1b. Habitatgeschiktheid. Evaluatie van de geschiktheid van SBZ's voor herintroductie en maatregelen voor gebiedsinrichting. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek. INBO.R.2016.11407499.

Bohl E. 1993. Rundmäuler und Fische im Sediment : Ökologische Untersuchungen zur Bestands- und Lebensraumsituation von Bachneunaugen *Lampetra planeri*, Schlammpeitzger *Misgurnus fossilis*, Steinbeisser *Cobitis taenia* in Bayern. Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung, München.

Bohmann K., Evans A., Thomas M., Gilbert P., Carvalho G.R., Creer S. et al. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution* 29: 358-369.

Brys R., Halfmaerten D., Jaccquemyn H. & Mergeay J. 2016. eDNA barcoding: een vernuftige techniek met veelzijdige toepassingen in het huidige ecologische onderzoek en natuurbeheer. *Natuur.focus* (15)3: 114-120.

De Bruin A. & Kranenbarg J. 2015. Graslanden Zwarte Water kraamkamer voor Grote modderkruiper en Kwabaal. *Nature Today* 17 juni 2015.

Deiner K., Bik H.M., Mächler E., Seymour M., Lacoursière Roussel A., Altermatt F. et al. 2017. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26: 5872-5895.

De Nie H.W. 1996. Atlas van de Nederlandse zoetwatervissen. Media publishing, Doetinchem, 88-89.

De Vocht A. & Gaethofs T. 2002. Bijdrage tot de historische verspreiding van zoetwatervissen, rivierkreeft en otter in Limburg België over de periode 1925-1965. Rapport van het samenwerkingsverband tussen het Centrum voor Milieukunde van het Limburgs Universitair Centrum, de vissenwerkgroep van LIKONA en de Provincie Limburg.

Drozd B., Kouril J., Blaha M. & Hamackova J. 2009. Effect of temperature on early life history in Weatherfish, *Misgurnus fossilis* L. 1758. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 392

Grieb A.W. 1937. Die larvale Periode in der Entwicklung des Schlammbeissers *Misgurnus fossilis* L., Cobitidae, Cyprinoidea. *Acta Zoolog.*, 18, 1-6.

Holcik J. ed. 1989. Threatened fishes of Europe. In: *The freshwater fishes of Europe*. 9. Aula Verlag, Wiesbaden.

Käfel G. 1991. Autökologische Untersuchungen an *Misgurnus fossilis* im March-Thaya Mundungsgebiet. PhD. Thesis. University of Vienna.

Keith & Allardi 2001. La loche d'étang *Misgurnus fossilis*. Atlas des poisons d'eau douce de France.

Kelly R.P., Port J.A., Yamahara, K.M. & Crowder L.B. 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *Plos ONE* 9, e86175.

Lelek A. 1987. Threatened fishes of Europe. In: *The freshwater fishes of Europe*. 9. Aula Verlag, Wiesbaden.

Meyer L. & Hinrichs D. 2000. Microhabitat preferences and movements of the Weatherfish *Misgurnus fossilis* in a drainage channel. *Environmental Biology of Fishes* 58: 297 - 306.

Nijssen H. & De Groot S.J. 1987. De vissen van Nederland. Stichting Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische vereniging, p. 94-95.

Philippart J.C. & Vranken M. 1981. Voor het behoud van onze visfauna. Vogelreservaten/VO 8720/7-18 en Natuurreservaten 28, 4bis, 41-50.

Raveret-Wattel. 1900. Atlas de poche des poissons d'eau douce de la France, de la Suisse et de la Belgique. Librairie des Sciences Naturelles. Paris.

Riaz T., Shehzad W., Viari A., Pompanon F., Taberlet P. et al. 2011. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 39: e145.

Schouten W.J. 1992. Habitatgeschiktheidsindex model. De Grote modderkruiper *Misgurnus fossilis*. Organisatie ter verbetering van de Binnenvisserij. Nieuwegein.

Sigsgaard E.E., Carl H., Møller P.R. & Thomsen P.F. 2015. Monitoring the near-extinct European Weather Loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation* 183: 46-52.

Svobodová Z., Lloyd R., Máchová J., & Vykusová B. 1993. Water quality and fish health. EIFAC Technical paper 54. Rome.

Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C. & Willerslev E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21: 2045-2050.

Vandelannoote A., Yseboodt R., Bruylants B., Verheyen R., Coeck J., Maes J. et al. 1998. Atlas van de Vlaamse Beek- en rivierissen. WEL vzw. Wijnegem.

Van Liefvering C. & Meire P. 2003. Onderzoek naar het voorkomen van Grote modderkruiper in Vlaanderen en meer specifiek naar de populatiegrootte en de overlevingskansen in het natuurreservaat het Goorcken te Arendonk. Rapport: ECOBE 03-R55.

Verreycken H., Belpaire C., Van Thuyne G., Breine J., Buysse D., Coeck J. et al. 2013. IUCN Red List of freshwater fishes and lampreys in Flanders north Belgium. *Fisheries Management and Ecology* 21, 122-132.

Vrielynck S., Belpaire C., Stabel A., Breine J. & Quataert P. 2003. De visbestanden in Vlaanderen anno 1840 1950. Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer en Afdeling Water AMINAL. IBWWb.V.R.2002.89.

Yinqiu J., Ashton L., Pedley S.M., Edwards D.P., Tang Y., Nakamura A. et al. 2013. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters* 16: 1245-1257.