

# Kan vi måle vandkvalitet i vandløb med DNA?

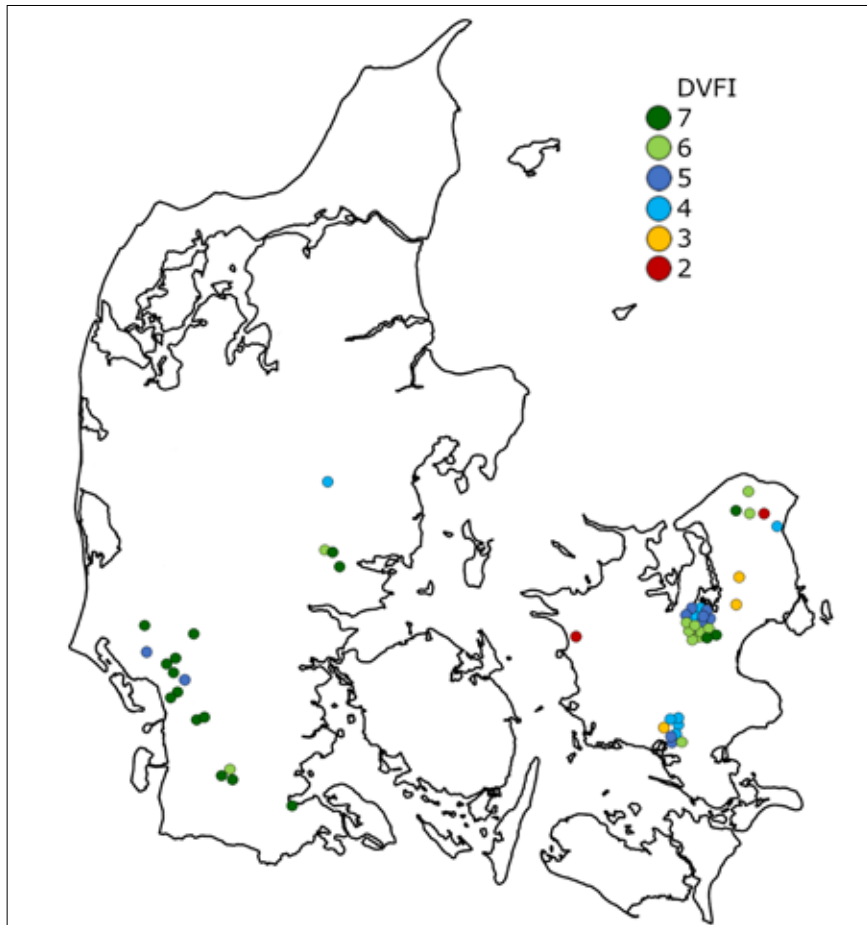
Nogle smådyr i vandløb er biologiske indikatorer for god og andre for dårlig vandkvalitet. Vandkvalitet i vandløb måles derfor ofte med biologiske metoder, fx baseret på optælling og identifikation af smådyr (invertebrater). Biologiske samfund, fx i vandløb, kan i dag også beskrives ved hjælp af DNA. Vi har sammenlignet DNA-analyser med en traditionel undersøgelse af biologisk vandkvalitet i 53 forskellige danske vandløb og undersøgt hvorvidt sammensætningen af DNA kan bruges til at udtale sig om vandkvaliteten. Resultaterne er meget lovende for fremtidig anvendelse af DNA teknologi til naturovervågning.

MARTIN HESSELSØE, NADIEH DE JONGE  
& JEPPE LUND NIELSEN

## Baggrund

Blandt ferskvandsinvertebraterne (SE BOKS 1) findes en række organismer, som stiller forskellige krav til omgivelserne (fx krav til iltindhold mm). Sådanne præferencer og krav til omgivelserne har været brugt til at udpege specifikke indikatororganismer for henholdsvis god og dårlig vandkvalitet. Vandkvalitet i vandløb måles derfor ofte med biologiske metoder, baseret på optælling og en taksonomisk identifikation af invertebrater. Dansk Vandløbs Fauna Index (DVFI) er den mest udbredte metode, der i dag anvendes i Danmark til kvalitetsvurdering af vandløb (SE BOKS 2). Anvendelse af DVFI-metoden kræver manuel

*Figur 1: Indsamling af 59 DVFI prøver fra 53 forskellige vandløb i Danmark. Figuren viser DVFI faunaklassen fra 2 til 7 på de enkelte lokaliteter bestemt ved manuel udsortering af makroinvertebrater. Parallele og samtidigt indsamlede prøver er analyseret dels ved konventionel udsortering og bestemmelse af DVFI og dels ved DNA metabarcoding.*



**BOKS 1: Makroinvertebrater**

(smådyr) er en fællesbetegnelse for smådyr på tværs af ordner og familier. Makroinvertebraterne i vandløb omfatter blandt andet vårfluer, døgnfluer, slørvinger, snegle og mange andre grupper af organismer. Smådyrene påvirkes af vandløbets kemiske og fysiske kvalitet. Derfor kan forekomst af bestemte indikatorarter afspejle vandløbets økologiske tilstand.

sortering og identifikation af invertebrater. Metoden er tidskrævende og kræver en stor taksonomisk ekspertise.

Vandrammedirektivet (2000/60/EC) forpligter EU-medlemslandene til at øge kvaliteten af overfladevand, så det har en "god miljømæssig tilstand". I Danmark bruges DVFI-metoden således ofte til at kortlægge den biologiske tilstand af vandløb. DVFI metoden inddeler vandløb i op til 7 forskellige faunaklasser. De tre bedste kategorier (DVFI 5, 6 og 7) defineres normalt som "god miljømæssig tilstand" i henhold til Vandrammedirektivet /1/.

**Prøvetagning**

I forbindelse med et erhvervs ph.d. projekt /2/ er der indsamlet 59 forskellige faunaprøver fra 53 vandløb overalt i Danmark (Figur 1). Prøvetagning er udført som foreskrevet i den aktuelle tekniske anvisning for monitorering ved hjælp af DVFI metoden /3/. Der er indsamlet to parallelle prøver fra hver lokalitet. Den ene prøve er analyseret på konventionel vis og DVFI faunaklasse er beregnet, som det

fremgår af den tekniske anvisning /3/. Den anden prøve blev fikseret i sprit umiddelbart efter indsamling og videre oparbejdet til DNA analyse. Den såkaldte "pilleprøve" er dog ikke anvendt i DNA analysen.

**DNA-analyse**

DNA analysen omfatter følgende trin som også er illustreret i Figur 3:

- 1) Den fikserede prøve blev homogeniseret i en blender. Umiddelbart før homogenisering er sprit fjernet fra den fixerede prøve, for at undgå sprit i DNA ekstraktionen. Alle øvrige dele i prøven (sediment, småsten, planterester mm.) medtages i homogeniseringen.
- 2) DNA ekstraktion fra den homogeniserede prøve (standard metode i laboratoriet).
- 3) Metabarcoding (se forklaring i BOKS 3)
- 4) Bioinformatisk multivariatanalyse (se forklaring i BOKS 4)

**Resultater**

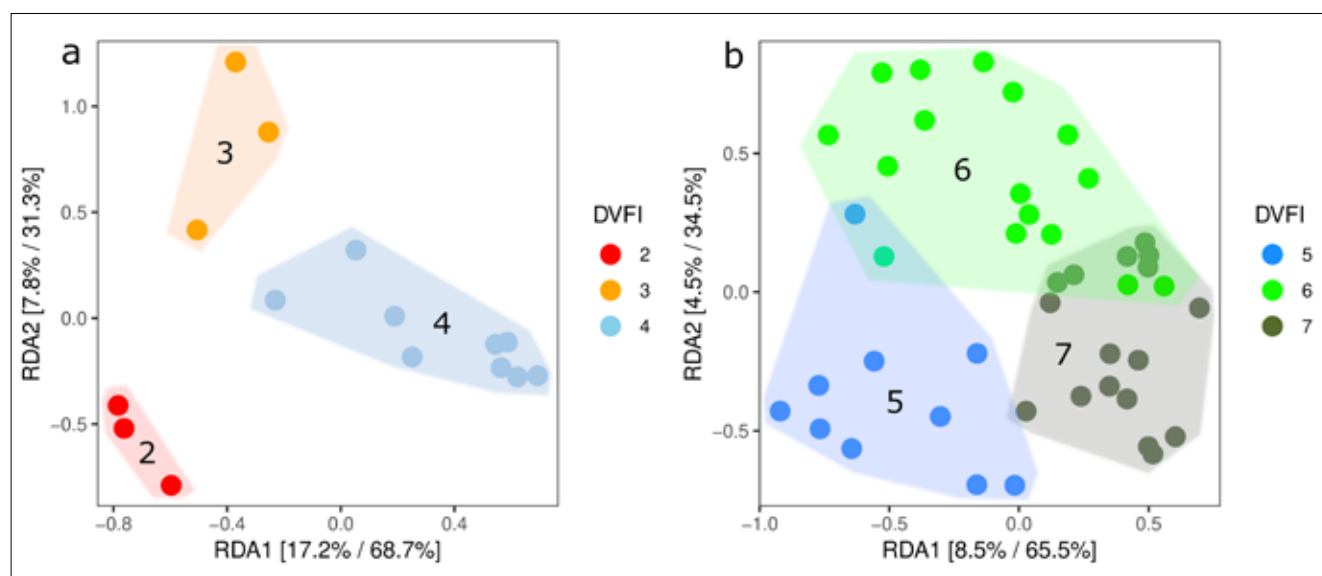
Konventionel DVFI analyse viser, at der blandt de 53 forskellige vandløb var 3, 3, 8, 10, 13 og 16 prøver fra henholdsvis DVFI kategorierne 2, 3, 4, 5, 6 og 7. I disse prøver blev der identificeret 145 unikke arter, svarende til et gennemsnit på 27 arter (+/- 8) pr DVFI prøve. Tæt på 2 mio DNA sekvenser blev sekventeret, svarende til et gennemsnit på 32.449 sekvenser pr lokalitet. Ved DNA metoden kunne 192 forskellige taksonomiske grupper identificeres, svarende til 61 (+/- 22) grupper pr lokalitet.

DNA sekvenserne blev efterfølgende analyseret og statistisk klassificeret ved hjælp af en

**BOKS 2: Dansk Vandløbs Fauna Indeks (DVFI)** benyttes til beskrivelse af den økologiske tilstand i åer og vandløb i Danmark. DVFI er baseret på identifikation og optælling af makroinvertebrater i en standardiseret faunaprøve, som er indsamlet i vandløbet. DVFI skalaen har syv trin (1-7) /3/. De tre bedste trin (5, 6 og 7) betegnes "god økologisk tilstand" i henhold til Vandrammedirektivets definition /1/.

såkaldt multivariatanalyse (BOKS4, Figur 2). Sammenholdes DNA sekvenserne fra metabarcoding af invertebrat-DNA med faunaprøver fra forskellige DVFI faunaklasser (bestemt ved konventionel udsortering) ses det, at de falder ens ud. Dette viser, at prøver med samme vandløbskvalitet ligner hinanden. Det ses af figuren, at de laveste DVFI faunaklasser (2, 3 og 4) adskiller sig betydeligt fra hinanden (Figur 2a), mens DVFI faunaklasserne, der repræsenterer en "god miljømæssig tilstand" (5, 6 og 7), ligger tættere og har enkelte mindre overlap (Figur 2b). Disse mindre overlap afspejler, at disse faunaklasser ligner hinanden meget, og at der er glidende overgange mellem enkelte faunaklasser.

Multivariatanalysen har således vist, at forskelle i DNA-sekvenserne mellem de enkelte prøver afspejler forskelle i DVFI-kategorier. Det er altså muligt at vurdere, hvilken DVFI-kategori en given ukendt prøve tilhører ud fra sammensætningen af DNA-sekvenser i en faunaprøve indsamlet fra lokaliteten. Dette er ikke overraskende, da både DVFI kategorierne og DNA sekvenserne afspejler faunaprøvens



Figur 2: Multivariatanalyse af DNA metabarcoding sekvenser fra 59 faunaprøver fra 53 forskellige vandløb i Danmark. Alle 59 prøver er samlet statistisk analyseret og sammenholdt i henholdsvis dem med lave DVFI kategorier (2, 3 og 4) (a) og dem med høje DVFI kategorier (5, 6 og 7) (b). Det ses at der opnås en god adskillelse mellem de forskellige DVFI kategorier. Figur 3 viser hvordan DVFI kategorien for en ukendt prøve kan bestemmes på dette grundlag.

biologiske sammensætning.

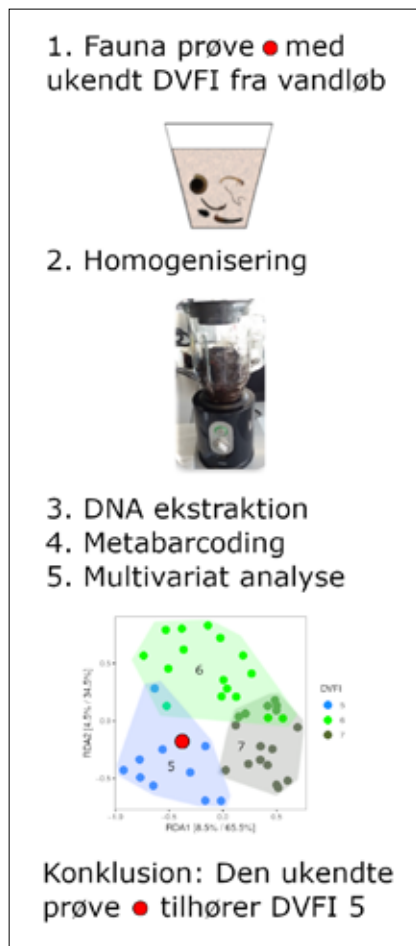
DNA resultaterne fra denne undersøgelse kan analyseres nærmere for at undersøge hvilke af de vigtige indikatororganismer, som genfindes i DNA sekvenserne. Dette arbejde er stadig i gang, men det er imidlertid ikke nødvendigt at "artsbestemme" de enkelte DNA-streng og -sekvenser, for at kunne anvende metoden i praksis til vurdering af vandløbs kvalitet.

### Konklusion:

Det er velkendt, at invertebrater er effektive til at vurdere vandløbskvalitet. Vi har vist, at DNA metabarcoding af invertebrater indsamlet i forskellige vandløb giver et unikt DNA fingeraftryk for hver prøve. En statistisk multivariat analyse har vist, at DNA fingeraftryk fra prøver med samme DVFI ligner hinanden mere, end prøver med forskellige DVFI kategorier. Det er således muligt at analysere en faunaprøve ved hjælp af DNA metabarcoding. Selv med den mest basale analyse af sekvensdata er klassificering af DVFI kategorier mulig.

Figur 3 viser princippet for DNA analyse af en ukendt prøve. Den røde markering viser placeringen af den ukendte prøve i forhold til de kendte prøver, som er analyseret i dette studie. Med DNA metabarcoding er det muligt at placere denne ukendte prøve i DVFI faunaklasse 5. Ved brug af statistiske metoder er det muligt, tillige at angive en sandsynlighed for, at prøven netop tilhører netop denne faunaklasse. Det er ligeledes vigtigt at påpege, at denne empiriske model må forventes at blive

**BOKS 3: DNA-metabarcoding** er en relativ ny DNA teknologi. Metoden baseret på to trin. Først ekstraheres og opformeres DNA fra en bred gruppe af organismer (f.eks. alle makroinvertebrater). Dernæst sekventeres alt det opformede DNA ved hjælp af moderne DNA sekvenseringsteknologi (såkaldt next-generation sekventering). Hver af de analyserede prøver resulterer i tusindvis af DNA sekvenser. Nogle af sekvenserne er ens, fordi de kommer fra den samme organisme. Det er ofte muligt at identificere DNA sekvenserne til arts eller slægtsniveau.



Figur 3: Princip for bestemmelse af DVFI kategorien for en ukendt faunaprøve, baseret på DNA metabarcoding og efterfølgende multivariat analyse.

bedre jo flere prøver det analyseres.

Den analysemetode, som vi har præsenteret, baseres på prøver, der er indsamlet med samme metode, som ved konventionel undersøgelse af vandløb. Omkostninger til indsamling af prøver svarer derfor til den konventionelle metode. Oparbejdning af prøven til DNA sekvensering og dataanalyse vil allerede i dag være konkurrencedygtig i forhold konventionel udsortering af makroinvertebrater. Da priser på DNA sekvensering er stadig faldende, må det forventes, at den nye metode vil blive stadig mere konkurrencedygtig. Resultaterne peger på et stort fremtidigt potentiale for brug af DNA teknikker til vurdering af vandkvaliteten i vandløb.

### TAK:

Tak til finansiering af Erhvervs PhD.-studium til Franziska Kuntke (Innovationsfonden Grant 1355-00144B og Amphi Consult ApS). Tak til Per Gørtz fra Fiskeøkologisk Laboratorium for udsortering og konventionel bestemmelse af DVFI kategorier for de undersøgte lokaliteter.

MARTIN HESSELSØE, ph.d. (MHES@niras.dk), Markedschef for natur og miljøbioteknologi i NIRAS A/S, Østre Havnegade 12, 9000 Aalborg (MH er tidligere direktør i Amphi Consult ApS).

NADIEH DE JONGE, post doc på Aalborg Universitet, Institut for Kemi og Bioteknologi, Fredrik Bajers Vej 7H, DK-9220 Aalborg Ø.

JEPPE LUND NIELSEN, Professor, Aalborg Universitet, Institut for Kemi og Bioteknologi, Fredrik Bajers Vej 7H, DK-9220 Aalborg Ø.

### Referencer

- Larsen, Friberg, Wiberg-Larsen, Skriver og Larsen: Konvertering af DVFI faunaklasser til EQR-værdier (økologisk kvalitets ratio). Vand og Jord (2013) nr. 1, Side 12-16.
- Kuntke, F (2018): Molecular techniques for monitoring biodiversity. Ph.D. afhandling fra Aalborg Universitet (Vejledere: Jeppe Lund Nielsen og Martin Hesselsoe).
- Wiberg-Larsen (2013): Makroinvertebrater (smådyr) i vandløb. Teknisk anvisning. Aarhus Universitet, DCE-Nationalt Center for Miljø og Energi (28 sider).

### BOKS 4: Bioinformatisk

**Multivariat analyse:** Fra hver prøve er der analyseret op til typisk 50.000 DNA sekvenser. DNA sekvenserne afspejler den relative sammensætning af makroinvertebrater i prøven. På grund af den store datamængde er sammensætningen af DNA sekvenser i en prøve unik, og svarer således til et fingeraftryk, der afslører sammensætningen i prøven. Multivariat analyse anvendes til at illustrere, hvor meget DNA sekvenserne fra forskellige prøver ligner hinanden. Multivariat analyse gør det altså muligt, at sammenligne tusindvis af DNA sekvenser fra forskellige prøver, og visualisere forskelle mellem prøverne.