



Rivierdonderpad en (links) monstername

NL-VISPOPULATIESCAN: SNEL EN EFFICIËNT VISPOPULATIES IN KAART BRENGEN MET eDNA METABARCODING

AUTEURS



Bart Wullings
(KWR Water)



Dennis van der
Pauw Kraan
(KWR Water)



Edwin Kardinaal
(KWR Water)



Michiel Hootsmans
(KWR Water)

Recent is de NL-Vispopulatiescan ontwikkeld. Deze methode maakt het mogelijk om met één analyse van DNA-sporen in het oppervlaktewater een volledige vispopulatie te detecteren. De eerste resultaten van monsters uit de Roer en een vergelijking met vangstgegevens uit een vistrap zijn veelbelovend.

eDNA: alternatief voor traditionele vismonitoring

Vanuit de Kaderrichtlijn Water (KRW) zijn waterbeheerders verplicht om de visstand periodiek te monitoren. Daarnaast worden onder meer vanuit Natura 2000 wetgeving ook visinventarisaties gedaan. Met traditionele inventarisatiemethoden, zoals elektrovisserij en visserij met zegen en kuil (een soort sleepnetten), is het niet gemakkelijk om zeldzame of moeilijk vangbare soorten op te sporen. Bovendien zijn deze technieken arbeidsintensief (en daarmee kostbaar) en verstoren ze de vis en het habitat. Het aantonen van vissen op basis van "DNA-sporen" (environmental DNA of eDNA) in het water(milieu) is een alternatief. Dit werd onderzocht in een samenwerkingsproject van KWR, de waterschappen Brabantse Delta, Limburg en Aa en Maas, ATKB, Witteveen+Bos en Baseclear

eDNA en metabarcoding

De eDNA methodiek is gebaseerd op het identificeren van DNA-sporen die levende organismen achterlaten in het milieu. eDNA in het water is vooral afkomstig van uitwerpselen, slijm en huid of schubben. Deze DNA-sporen verspreiden zich in het water en worden langzaam en afhankelijk van o.a. de watertemperatuur in ongeveer twee weken afgebroken. In stilstaand water zal DNA zich maar weinig verplaatsen, maar in stromend water zal het zich verspreiden en zo verder verdunnen. Om het eDNA van alle vissoorten in een watermonster te "vangen" is een goede bemonsteringsstrategie noodzakelijk. Zo'n strategie heeft oog

0 basenparen verschil	1 basepaar verschil	2 basenparen verschil	3 basenparen verschil
Grote Marene -Houting	Giebel-Goudvis	Snoekbaars – Baars	Ruisvoorn-Alver
Bronforel-Beekforel-Zeeforel		Beekdonderpad –Rivierdonderpad	Alver-Kolblei
		Zalm-Grote Marene	Zilverkarper-Grootkopkarper
		Winde-Serpeling	Kroeskarper-Giebel
			Kroeskarper-Goudvis

Tabel 1: Verschillen in DNA van de geanalyseerde "barcode" tussen de meest verwante Nederlandse vissoorten.

voor alle ecologisch verschillende leefgebieden in een plas of riviervak. Bemonstering moet op de juiste diepte, de juiste afstand van de oever en op meerdere plaatsen in het water plaatsvinden.

Met de in dit onderzoek ontwikkelde metabarcoding analyse worden de aanwezige vissoorten geïdentificeerd op basis van hun unieke DNA-code. Hiervoor is een kort DNA-fragment van ongeveer 110 bouwstenen van het 16S rRNA gen geselecteerd (regio 42' tot 45' van het 16S rRNA gen van vissen (uit Satoh et al. BMC Genomics (2016) 17:719)). Dit gen is aanwezig in de mitochondriën van vissen. De samenstelling van dit stukje DNA is uniek voor vrijwel elke vissoort, en kan zo fungeren als unieke "barcode". Alleen bij zeer verwante vissoorten zijn de verschillen gering of afwezig, zoals bij forellen en Grote marene/Houting (tabel 1). Met specifieke DNA-technieken worden in alle monsters alleen deze stukjes DNA selectief vermenigvuldigd en vervolgens geanalyseerd met next-generation sequentieanalyse (NGS). In samenwerking met Baseclear is de DNA-volgorde van al deze fragmenten vergeleken met DNA "barcodes"

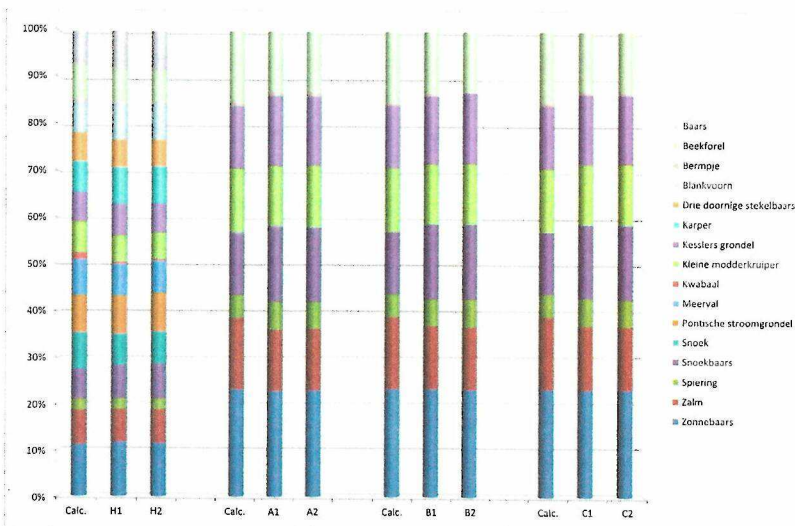
van Nederlandse zoetwatervissen. Het hier beschreven onderzoek is het eerste resultaat van een uitgebreide studie.

Kwaliteitscontrole van de metabarcoding

De kwaliteit van elke run van de NL-Vispopulatiescan is "geijkt" met een speciaal watermonster, een "Mock gemeenschap". Dit is een kunstmatig monster met daarin het DNA van 16 verschillende vissoorten. Dit monster wordt in elke analyse meegenomen om de procedure van DNA-vermenigvuldiging tot aan de identificatie te verifiëren. Ook de gevoeligheid van de methode is geanalyseerd. Het DNA van enkele van de vissoorten in de Mock test is in zeer lage concentratie toegevoegd. Uit de resultaten van de Mock monsters blijkt dat alle gekozen vissoorten zijn gedetecteerd. De hoeveelheden van de geïdentificeerde DNA-fragmenten komt zeer goed overeen met de starthoeveelheden (zie figuur 1). Ook "sporen" van 5 tot 10 DNA-kopieën zijn bij alle Mock monsters gedetecteerd. De metabarcoding analyse doorstond deze Mock test dus met glans.

Met eDNA
visstand bepalen

4



Figuur 1: Percentage van de geïdentificeerde DNA-fragmenten in de verschillende metabarcoding analyses van de Mock monsters (serie H, A, B en C). Deze series verschillen in de aantallen DNA-fragmenten die van elke vissoort zijn toegevoegd. Serie H is samengesteld uit DNA van 16 vissoorten. In serie A, B en C zijn van de vissoorten Baars, Blankvoorn, Karper, Pontische stroomgrondel, Driedoornige stekelbaars, Snoek, Kwabaal en Meerval resp. 100 (A), 10 (B) en 5 (C) DNA kopieën toegevoegd. Van de overige vissoorten is het aantal DNA-fragmenten in de serie A, B en C gelijk aan dat in serie H. In de kolom "Calc." wordt het percentage weergegeven van het DNA van de vissoort dat in de betreffende Mock is toegevoegd en steeds in de twee daarop volgende kolommen (1 resp. 2) het percentage dat met de metabarcoding in duplo is gemeten.

Soort	Stroomopwaards →							DNA tot	ECI 2009-2014
	OROER905	OROER715	OROER550	OROER520	OROER440	OROER312	OROER195		
Alver									3016
Baars									72574
Barbeel									754
Beekdonderpad									542 ^a
Beekforel/Zeeforel/Bronforel									192+406+374 ^b
Berpje									6
Bittervoorn									6
Blankvoorn									15195
Blauwband									79
Brasem									11019
Donaubrasem									7
Drie doornige stekelbaars									34
Elrits									36
Gestippelde alver									
Giebel/Goudvis									91
Goudvis									1
Grote marene									1
Karper									33
Kesslers grondel									6
Kleine modderkruiper									1
Kolbei									192
Kopvoorn									272
Marmrgrondel									382
Meerval									48
Paling									3793
Pos									3353
Ruisvoorn									362
Rivierdonderpad									542 ^a
Riviergrondel									135
Ruisprik ^c									140
Roofblei									81
Serpeling									1125
Siberische steur ^d									12
Sneep									116
Snoek									96
Snoekbaars									816
Tien doornige stekelbaars									3
Vetje									9
Vlagzalm									6
Winde									116
Zalm									8235
Zeelt									85
Zaagprik ^c									64
Zonnebaars									120
Zwartbek grondel									2408
Aantal soorten	22	26	21	26	24	26	23	34	45

Figuur 2: Geïdentificeerde vissoorten op verschillende locaties langs de Roer bij waterschap Limburg vergeleken met het aantal gevangen individuen per soort in de periode 2009-2014 bij de ECI stuw te Roermond
 a. In het ECI onderzoek is geen onderscheid gemaakt tussen de twee moeilijk van elkaar te onderscheiden donderpadden;
 b. De verschillende forellen behoren tot één soort; c. Deze soorten zijn niet geanalyseerd in de metabarcoding analyse.

Praktijkresultaten

De NL-Vispopulatiescan is toegepast bij de drie deelnemende waterschappen op verschillende locaties, en vooral in stromende wateren. Voor de bemonstering is een werkvoorschrift opgesteld voor zwak- en snel stromende waterlopen. De eerste resultaten van monsters uit de Roer zijn nu beschikbaar. De resultaten van de overige locaties en een vergelijking met de inventarisatie volgens de traditionele, gestandaardiseerde KRW methode presenteren we in een vervolgartikel (in een volgende editie van Water Matters). Voor Waterschap Limburg zijn op één dag op zeven locaties in de Roer monsters genomen (zie figuur 2). In totaal zijn in de zeven eDNA-analyses 33 verschillende vissoorten gedetecteerd. Vervolgens zijn de geïdentificeerde vissoorten vergeleken met de

vangstgegevens van de vistrap bij de ECI centrale in de Roer bij Roermond. In 5 jaar zijn hier 45 vissoorten aangetroffen. Met deze eendaagse metabarcoding bemonstering zijn slechts acht vissoorten minder aangetroffen dan in de vijf jaar onderzoeksperiode bij de ECI vistrap (NB steuren en prikken zijn niet meegenomen in de eDNA-analyse). Met de metabarcoding is in één watermonster de Gestippelde alver aangetoond. Die is niet bij de ECI gevangen, maar wel aangetoond bij KRW-visstandbemonsteringen in de Roer. Voor vissoorten zoals de Alver, Baars, Blankvoorn, Brasem, Paling, Pos, Serpeling en Zwartbekgrondel komt het beeld van de vangsten bij de ECI (>1.000 individuen) overeen met het beeld in de metabarcoding analyse. Er was een aanmerkelijk verschil tussen de visvangsten van de Zalm en de DNA-analyse. Dit

kan komen door het trekgedrag van deze vissoort, waardoor deze alleen in bepaalde perioden van het jaar aanwezig is. Om beter inzicht te krijgen in de volledigheid en betrouwbaarheid van de metabarcoding analyse zullen de resultaten in een later stadium uitgebreid worden vergeleken met de vissoorten die met de KRW methode zijn gevonden.

Conclusies

- Een goed werkvoorschrift voor de bemonstering van waterlopen voor eDNA analyse is essentieel;
- De 16S barcode van de NL-vispopulatiescan heeft een zeer groot onderscheidend vermogen voor vrijwel alle in Nederland voorkomende zoetwater-vissen;
- De next-generation sequentieanalyse (NGS) is gevalideerd: de methodiek is reproduceerbaar en zeer gevoelig (≥ 5 DNA-kopieën/monster);
- Een Mock test is een waardevolle toevoeging waarmee de betrouwbaarheid van de analyses kan worden vastgesteld;
- In de Roer zijn op één dag zeven watermonsters genomen en geanalyseerd met de metabarcoding methodiek. In de monsters zijn 33 van de 45 vissoorten aangetoond zoals die in 5 jaar onderzoek bij de ECI stuw zijn gevangen. Eén soort, de Gestippelde alver, is wel aangetoond met de metabarcoding analyse en niet gevangen bij de ECI stuw;
- Een vergelijking tussen de resultaten van de metabarcoding analyse en de aanwezige vissoorten volgens traditionele KRW-bemonsteringen moet nog uitgevoerd worden. Rapportage daarover volgt later.
- De NL-vispopulatiescan is een geavanceerde methodiek waarmee relatief snel en kosteneffectief de soortensamenstelling van de visstand valt te bepalen. Voor routinematige toepassing zou een norm moeten worden opgesteld waarin criteria worden vastgelegd waaraan een metabarcoding methode moet voldoen. Een Mock test moet in elke analyse worden meegenomen.

In dit project is samengewerkt door de waterschappen Limburg, Aa en Maas en Brabantse Delta, Milieuvakbureau ATKb, Advies- en ingenieurs-

bureau Witteveen+Bos, Genomic services Baseclear en KWR Watercycle Research Institute. Financiering kwam mede uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken (Topsector Water). Naturalis en Sportvisserij Nederland hebben bijgedragen aan het tot stand komen van de vissenbarcode database.

Bart Wullings

Dennis van der Pauw Kraan

Edwin Kardinaal

Michiel Hootsmans

(KWR Water)

Met eDNA
visstand bepalen

SAMENVATTING

Waterbeheerders moeten periodiek de toestand van hun visbestand bepalen, bijvoorbeeld voor de Kaderrichtlijn Water (KRW). Afhankelijk van het watertype bepalen ze, naast de soortensamenstelling, aantallen of biomassa gegevens. Nieuwe methoden die zich richten op de aanwezigheid van eDNA (sporen) zijn een goedkoop en diervriendelijk alternatief ten opzichte van traditionele visstandbemonstering en mogelijk ook betrouwbaarder door een hogere detectiekans. Voor monitoring van de soortensamenstelling van een vispopulatie is een nieuwe eDNA metabarcoding ontwikkeld, de NL-Vispopulatiescan. De methode is gevalideerd en er is een waterbemonsteringsprotocol opgesteld. De eerste resultaten laten zien dat in de geanalyseerde wateren met deze metabarcoding een grote diversiteit aan vissoorten is aangetoond.