



AUTEURS



Miriam Schutter en Nils van Kessel
(Bureau Waardenburg)



Kees van Bochove
(Datara Molecular
Solutions)



Michiel Hootsmans
(KWR Water Research
Institute)



Mervyn Roos en Gerrit Vossebelt
(Rijkswaterstaat)



MONITORING VAN VISSSEN IN GROTE RIVIEREN MET EDNA METABARCODING

Vissen en andere waterdieren laten DNA-sporen achter in het water. Analyse van dit 'environmental DNA' (eDNA) is een nieuwe manier om de soortensamenstelling van wateren te monitoren. In de grote rivieren is dit echter niet zo eenvoudig. DNA-sporen kunnen gemakkelijk verplaatst en verdund worden. In deze studie is het aantonen van riviervissen onderzocht in de Rijn, het Haringvliet en de Nieuwe Waterweg.

Rijkswaterstaat is verantwoordelijk voor een goede ecologische toestand van de rijkswateren volgens de Kaderrichtlijn Water (KRW). De visstand is één van de indicatoren. In dit onderzoek is onderzocht of eDNA metabarcoding een effectieve en betrouwbare methode is voor monitoring van vissoorten in stromende rivieren, zoete getijdewateren en estuaria.

eDNA metabarcoding

Vissen laten DNA-sporen achter in het water, bijvoorbeeld via huidslim en/of ontlasting. Dit eDNA wordt na verloop van tijd meestal gedegradeerd tot kortere DNA-fragmenten. Dit DNA kan uit een watermonster geëxtraheerd en vervolgens geïdentificeerd worden, om het voorkomen van vissoorten kwalitatief aan te tonen (aan- of afwezigheid, "community

analysis"). De basenvolgorde ofwel genetische code van zulke DNA-stukjes is soortspecifiek, waardoor identificatie mogelijk is door vergelijking met een referentiedatabase van in ons geval vissoorten.

Voordeel van eDNA metabarcoding is dat het fysiek vangen en determineren van een vis niet altijd meer nodig is. Voordeel is ook dat de identificatie van 'lastige' soorten niet meer afhankelijk is van de beschikbaarheid van specialisten. Daarnaast kan deze techniek vissen aantonen die moeilijk te vangen zijn, bijvoorbeeld omdat ze een verscholen bestaan leiden of erg zeldzaam zijn. Grote stromende wateren bieden een extra uitdaging. Zo betekent de aanwezigheid van eDNA op een bepaalde plek niet per definitie dat de betreffende soort daar aanwezig is. eDNA kan meestromen vanuit bovenstroomse gebieden of afkomstig zijn van bijvoorbeeld visafval. De methode is in ontwikkeling, en ons onderzoek is een stap naar een protocol voor de eDNA-monitoring van vissoorten in grote stromende wateren.

Onderzoekopzet

In 2018 hebben we door het jaar heen 6 keer monsters genomen in de Rijn bij Lobith, de Nieuwe Waterweg en het Haringvliet, vanaf een boot met een slangenpomp. Dat deden we in het voorjaar (maart, april, mei) en het najaar (september, oktober, november). Bij elke monsternamen werd langs drie raaien dwars over het waterlichaam op 10 punten 100 milliliter water bemonsterd, wat telkens werd samengevoegd tot een mengmonster van 1 liter. Dit werd voor elke raai drie keer gedaan: aan de oppervlakte, 1 meter boven de bodem en uit de oever (dus 3 habitats).

Alle mengmonsters zijn in het veld gefilterd. Het filtermembraan is geconserveerd voor DNA-extractie in het lab. Voor elk watermonster zijn nieuwe steriele materialen gebruikt. Op alle locaties is telkens ook gedestilleerd water zonder DNA gefilterd, om een indruk te krijgen van mogelijke contaminatie in het veld.

Om inzicht te krijgen in de invloed van de manier van bemonsteren, deden wij in mei en oktober aanvullend een detailbemonstering. Per waterlichaam namen

we 10 monsters van 1 liter langs de meest benedenstroomse raai, aan de oppervlakte en 1 meter boven de bodem.

Laboratoriumanalyse

Laboratoriumanalyse is uitgevoerd met specifieke primers voor de detectie van twee stukjes DNA uit twee mitochondriële genen van vissen. Na detectie zijn ze middels PCR vermeerderd. Vervolgens is de precieze basenvolgorde vastgesteld met *Next Generation Sequencing*. Identificatie van soorten volgde uit vergelijking met gegevens uit een database. We deden een aantal controles om de gevonden resultaten te kunnen checken. Zo is als positieve controle een *mock community* geanalyseerd, een monster met DNA-fragmenten van een aantal zoet- en zoutwater vissoorten in bekende concentraties. Ook is een aantal negatieve controles ingebouwd om een indruk te krijgen van de contaminatie die kan optreden tijdens DNA-extractie en PCR. Een laatste punt is dat laboratoria kunnen verschillen in de methodes die ze gebruiken. Daarom hebben we willekeurig een twintigtal monsters door zowel DATURA Molecular Solutions als door KWR Water Research Institute laten analyseren.

Bewerking en analyse van data

De verkregen barcodes en het aantal *reads* per barcode zijn bewerkt middels bioinformatica. Doel hiervan is het verwijderen van PCR- en sequentiefouten en het verkleinen van de kans op vals-positieve detecties (bijvoorbeeld door contaminatie). Nadeel is wel dat hierdoor zeldzamere soorten, met een laag aantal *reads*, uit de dataset kunnen verdwijnen. Er is daarom een vergelijking gemaakt tussen voorzichtige en rigoureuze instellingen van de bioinformatica stappen.

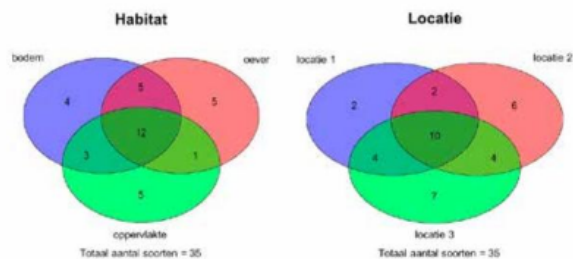
Resultaten

Voor elk van de drie wateren gold dat de gemiddelde soortenrijkdom voor de drie raaien en de drie habitats ongeveer gelijk was. Het totaal aantal soorten werd wel hoger naarmate meerdere habitats of locaties werden bemonsterd. Ter illustratie is in afbeelding 1 voor het Haringvliet het aantal vissoorten weerge-

DNA-monitoring
vissen in grote
rivieren

36

Afbeelding 1: Venn-diagrammen van het aantal overeenkomstige en unieke soorten per habitat (links) en per raai (rechts) in het Haringvliet. Overlapps geven overeenkomstige soorten aan



geven per habitat en per raai. Hoewel in de oever-habitat en langs de meest stroomafwaarts gelegen raai 3 de meeste soorten zijn vastgesteld, leveren alle overige bemonsteringen van habitats en raaien aanvullende soorten op. Het nemen van meerdere monsters en/of het bemonsteren van meerdere habitats/locaties is dus noodzakelijk om een completer beeld van de soortensamenstelling te verkrijgen. De gemiddelde soortenrijkdom was voor het Haringvliet en de Rijn relatief constant over het jaar heen. In de Nieuwe Waterweg daalde de soortenrijkdom van maart tot oktober, waarna deze weer toenam in november. De soortensamenstelling verschilde wel, wat waarschijnlijk komt door de migratie van sommige soorten in bepaalde perioden.

Invloed van de manier van bemonsteren

Analyse van de detailmonsters is gebruikt om de mogelijke invloed van de manier van bemonsteren op de resultaten in beeld te brengen. Met soortenverzadigingscurves (afbeelding 2a) hebben we in beeld gebracht hoeveel detailmonsters van 1 liter nodig zijn voor een compleet soortbeeld. Voor een compleet beeld op 1 moment in het Haringvliet zijn bijvoorbeeld minimaal 10 à 20 monsters nodig. In soortenrijkere wateren kan een hoger aantal nodig zijn. Ook het seizoen is van invloed. Het aantal gedetecteerde soorten in één mengmonster is vanzelfsprekend meestal lager dan in 10 detailmonsters van 1 liter. Dit is geconstateerd voor zowel oppervlakte- als bodemmonsters in alle drie de wateren. Ter illustratie, in het Haringvliet werden in één mengmonster van de bodem 4 KRW-doelsoorten gedetecteerd (afbeelding 2c, rode lijn), in de 10 corresponderende detailmonsters 7. Een uitzondering deed zich voor in mei in de Nieuwe Waterweg toen in

één mengmonster ruim 25 KRW-doelsoorten werden gedetecteerd, tegen 31 in de detailmonsters.

Verschillen tussen laboratoria

Detectie en analyse van dezelfde monsters door de laboratoria van DATURA en KWR leverden grotendeels overlappende soortenlijsten op (62%). Het verschil komt deels doordat de labs verschillen in hoe ze de identificatie uitvoeren: met primers van één of van twee mitochondriële genen. Daarnaast verschillende referentiedatabases en de bioinformatica instellingen. Het is ook kenmerkend voor eDNA-monitoring op dit moment: de methode is sterk in ontwikkeling, standaardisatie is nog ver weg.

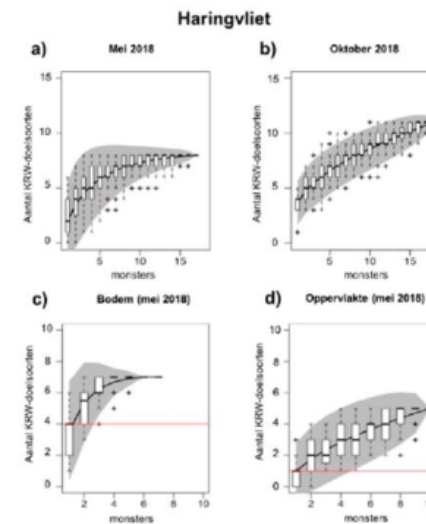
Betekenis voor de praktijk

Onze resultaten laten zien dat eDNA metabarcoding geschikt is om een kwalitatief beeld te verkrijgen van de soortensamenstelling van een visgemeenschap in stromende wateren. Daarbij is het nemen van meerdere monsters met ruimtelijke variatie (locatie, habitat) en/of seizoensvariatie noodzakelijk om een zo volledig mogelijk soortbeeld te verkrijgen. Het nemen van meerdere detailmonsters met een groter volume levert over het algemeen meer gedetecteerde soorten op dan een mengmonster met een kleiner volume per deelmonster, maar vereist ook een grotere onderzoeksinspanning in het veld en in het laboratorium. Bij de bemonstering van een waterlichaam zijn 15-25 monsters van 1 liter voldoende om circa 90 procent van de aanwezige soorten te detecteren.

Voor het genereren van een consequente en betrouwbare meerjarige dataset voor vismonitoring is het zoals altijd belangrijk dat methoden en werkprotocollen worden gedocumenteerd, zodat heranalyse van

Afbeelding 2.

Boven: soortenverzadigingscurves voor KRW-doelsoorten in het Haringvliet op basis van detailmonsters in mei 2018 (a) en oktober 2018 (b). Bodemmonsters en oppervlakte monsters zijn samen genomen (20 monsters). Onder: een vergelijking tussen het aantal KRW-doelsoorten gedetecteerd in één mengmonster (rode lijn) en de soortenverzadigingscurve van tien detailmonsters verzameld op dezelfde locatie, in dezelfde maand en in hetzelfde habitat (bodem (c) en oppervlakte (d))



ruwe datasets met herziene inzichten mogelijk blijft (bioinformatica en referentie databanken). Op termijn, als methoden (inter)nationaal voldoende zijn doorontwikkeld, zal standaardisatie hier ook behulpzaam bij zijn.

Toekomstig onderzoek

Om te komen tot een operationeel toepasbaar protocol worden nog enkele zaken verder onderzocht, zoals de invloed op de volledigheid van het gemeten soortbeeld van grotere volumes per monster, verschillende filtertypen en de bemonsteringsinspanning (ruimtelijk en temporeel). Daarnaast wordt onderzocht hoe de kosten en baten zich verhouden ten opzichte van de traditionele visbemonstering.

Het benutten van ecologische kennis gesteund door aanvullend visonderzoek (zoals traditionele visbemonstering) blijft onontbeerlijk om de resultaten van deze nieuwe methodiek en de daaruit volgende interpretaties te waarborgen. Bijvoorbeeld, de geografische dekking van eDNA-monsters kan anders zijn dan van traditionele bemonsteringstechnieken. Gedetecteerd eDNA is niet per se afkomstig van de directe omgeving van de bemonsteringslocatie. Daardoor wijst de detectie een soort met eDNA niet altijd onomstotelijk op de lokale aanwezigheid van soorten. Aanvullend (veld)onderzoek, *expert judgement* en degelijke controlestappen moeten de kans op misinterpretaties tot het minimale reduceren. Waarbij niet moet worden vergeten dat de traditionele vismonitoring ook zo haar eigen beperkingen kent.

Miriam Schutter en Nils van Kessel [Bureau Waardenburg], Kees van Bochove [Datura Molecular Solutions], Michiel Hootsmans [KWR Water Research Institute], Mervyn Roos en Gerrit Vossebelt [Rijkswaterstaat]

Referenties

Beentjes K. 2020. Deltafact: DNA-technieken voor waterbeheerders. STOWA. <https://www.stowa.nl/nieuws/dna-technieken-voor-waterbeheerders>

Schutter, M., N. van Kessel, K. Van Bochove, M. Hootsmans & E. Kardinaal, 2019. Effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring rijkswateren. Bureau Waardenburg Rapportnr. 19-147 Bureau Waardenburg, Culemborg.

SAMENWATTING

Vissen laten DNA-sporen achter in het water. Analyse van dit 'environmental DNA' (eDNA) is een nieuwe manier om vissen te monitoren. In dit onderzoek is gekeken hoe deze 'eDNA metabarcoding' het beste kan worden aangepakt in de grote rivieren, waar de stroming de resultaten sterk kan beïnvloeden. Analyse van eDNA blijkt ook hier een gedegen methode om de vissoortensamenstelling in beeld te brengen. Wel is de manier van bemonsteren cruciaal, en ecologische kennis blijft noodzakelijk voor een correcte interpretatie.

DNA-monitoring vissen in grote rivieren