

Monitoring van vispopulaties met eDNA van wens naar werkelijkheid

Michiel Hootsmans

KWR Watercycle Research Institute

Van bron tot kraan en verder.....

KWR? Die doen toch alleen drinkwater?

KWR = onderzoeksinstituut van de DW sector, maar beperkt zich niet tot drinkwater

KWR = not for profit met focus op water(kwaliteit) in alle facetten

KWR = brugfunctie tussen wetenschap en de praktijk

KWR = jarenlange ervaring met inzet moleculaire technieken
bij (oppervlakte)waterbeheer; goede relaties met waterbeheerders
en uitvoerende laboratoria





- Fundamenteel en toegepast innovatief onderzoek en commerciële dienstverlening
- Combinatie van taxonomie, ecologie en genetica
- Zoetwater en marien, ook bodem en lucht (pollen)
- Inzicht in ecosysteem functioneren & effecten van menselijk handelen
- Stimuleren van transitie naar genetische biomonitoring: alternatieve analyses en ecologische indexen
- Kwaliteitsborging en standaardisatie
- Publieke en privaat gefinancierde projecten – markt en subsidies

www.biomon.nl

Monitoring van ecologische waterkwaliteit met (e)DNA

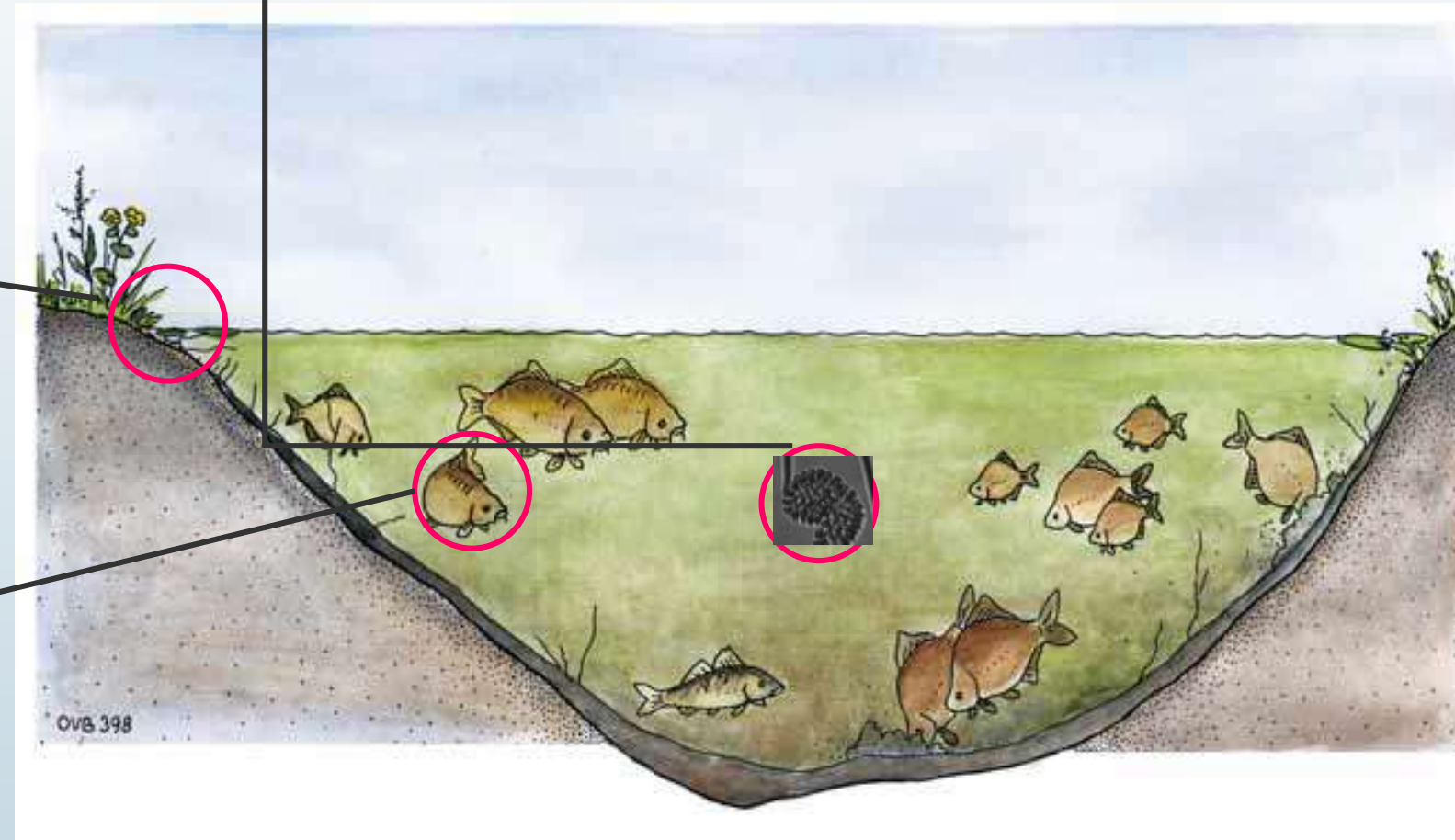
Een nieuw venster op biodiversiteit

■ Gericht en kwantitatief opsporen van soorten: qPCR

- Monitoren van cyanobacteriën
- Zwemwaterparameters: enterococcen, *E. coli*
- Bronopsporen van fecale verontreiniging (humaan, vogels, paarden, honden, varkens & herkauwers)
- Ziekte van Weil (*Leptospira* + Bruine rat)

■ Biodiversiteit (metabarcoding: NGS)

- o.a. vissen, macrofauna, diatomeeën
- RWZI's: bv effect effluent in opp. water (pathogenen, antibiotica resistentie genen)



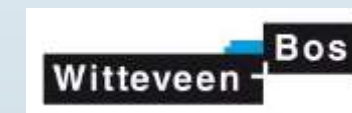
Vandaag: eDNA toepassingen bij vismonitoring

Onderzoeksfocus:

- Inzet eDNA als instrument bij het beheer van vispopulaties
 - Verspreiding soorten over een stroomgebied (kwalitatief, ongericht: met NGS; gericht en kwantitatief: met qPCR)
 - Connectiviteit en (dus) mogelijke migratie belemmeringen detecteren

Samenwerking:

- Drie waterschappen (BD, A&M, R&O=WL)
- Twee adviesbureaus (W+B, ATKB)
- BaseClear als technologie partner
- Mede gefinancierd uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken (Topsector Water & Maritiem)



Metabarcoding

eDNA voor identificatie (barcode)

- Doel: een metabarcoding methode ontwikkelen, specifiek voor Nederlandse zoetwatervissen en publiek beschikbaar.
- Onderzoeksvraag: Is het mogelijk om een geschikt DNA fragment te vinden om daarmee het voorkomen te bepalen van 75 Nederlandse zoetwatervissen?



Metabarcoding

Ontwerp primers

- Selectie DNA-regio (barcode) met verschillende kenmerken:
 - Veel kopieën in de cel (dus DNA in mitochondriën)
 - Voor vissen typerende, vaste DNA-volgorde als basis voor ontwerp primers, én
 - Voldoende variatie in de barcode om 'alle' vissoorten te onderscheiden
 - Geen overlap met bestaande patenten
- Geselecteerd: DNA-fragment van 16S rRNA gen op de mitochondriën

8 primerparen

- 1 F1+R2 baarzen
- 2 F2+R1 karpers
- 3 F3+R2 harders, stekelbaarzen, gup, grondels, rivierdonderpad, zalmachtigen
- 4 F3+R1 snoek, paling, fint en elft
- 5 F4+R2 kwabaal
- 6 F2+R3 Europese meerval
- 7 F4+R4 prikken
- 8 F3+R5 steuren

Metabarcoding

Evaluatie barcode *in silico*

- Zeer groot onderscheidend vermogen
 - Vrijwel alle in NL voorkomende vissen worden onderscheiden (momenteel 63 soorten of soortcomplexen beschikbaar in onze barcode bibliotheek)

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

Metabarcoding

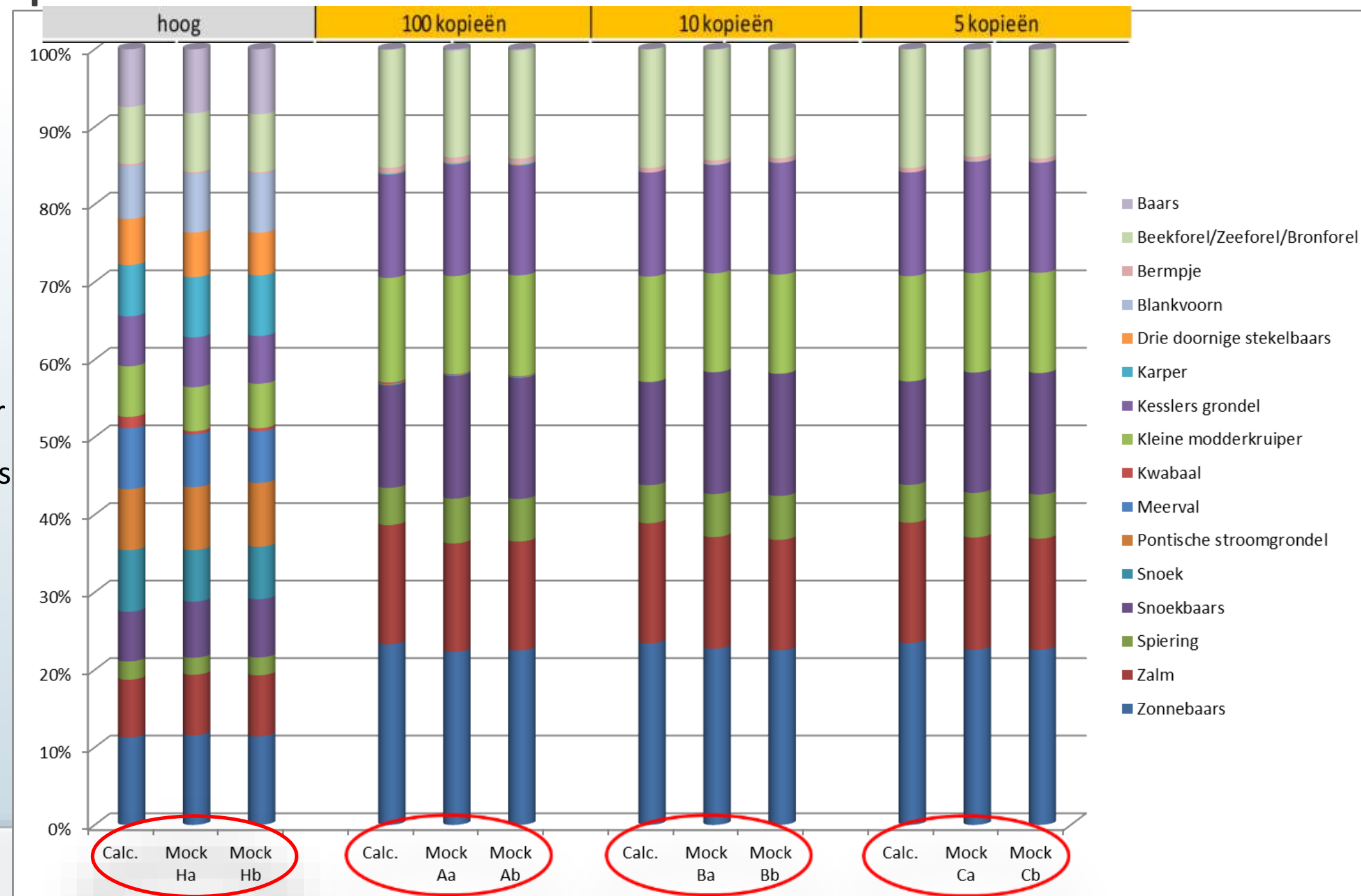
Optimalisatie en validatie *in vitro*

- Belangrijke test: samenstellen van een Mock community (artificiële vispopulatie met bekende DNA-concentratie per soort)
 - Hoe reproduceerbaar is de analyse van een monster? Twee replica monsters
 - Hoe gevoelig is de detectie? Wat is de detectielimiet?
- Zuiver DNA van 16 vissoorten, goed verdeeld over 6 primer combinaties
- Eén 'hoog' monster: relatief hoge dichtheden DNA kopieën voor alle 16 soorten
- En drie monsters met voor 8 soorten een zeer lage dichtheid (100-10-5 kopieën in een analysemonster van 5 µl); elk van de overige 8 soorten in dezelfde dichtheid als het 'hoge' monster

Metabarcoding: reproduceerbaarheid

Mock community

- Prima reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid ten opzichte van de berekende aantallen DNA kopieën
- Let op: het aantal kopieën per zichtbare soort in de monsters van serie A, B en C is gelijk aan serie H!
- Percentages veranderen echter als acht soorten sterk dalen in aantal



Metabarcoding: gevoeligheid

Mock community: zelfs 5 DNA kopieën in 5 µl gedetecteerd

	hoog		100 kopieën		10 kopieën		5 kopieën	
	Mock Ha	Mock Hb	Mock Aa	Mock Ab	Mock Ba	Mock Bb	Mock Ca	Mock Cb
reads per soort	122514	89953	118885	110677	83422	102712	109964	108341
Baars	10101	7525	239	173	57	87	75	94
Beekforel/Zeeforel/Bronforel	9296	6714	16327	15401	11873	14305	15144	15144
Bermpje	240	176	637	609	425	566	624	545
Blankvoorn	9292	6830	187	199	63	60	82	60
Drie doornige stekelbaars	7034	4942	113	89	6	5	4	2
Karper	9512	7017	144	115	5	5	10	5
Kesslers grondel	7861	5539	17067	15627	11627	14767	15741	15329
Kleine modderkruiper	6942	5138	15011	14375	10624	13112	14071	13978
Kwabaal	503	350	21	30	2	2	1	2
Meerval	8307	5994	94	75	8	4	2	1
Pontische stroomgrondel	9954	7401	109	98	3	6	7	6
Snoek	8131	6070	72	65	1	2	6	0
Snoekbaars	8851	6751	18758	17217	13067	16143	17016	16931
Spiering	2682	2066	6850	6065	4616	5808	6319	6156
Zalm	9560	7073	16598	15516	11995	14591	15890	15488
Zonnebaars	14151	10261	26489	24871	18919	23106	24794	24447
Unclassified	24	13	14	16	22	10	10	14

Kwantitatieve soortdetectie (qPCR)

Ontwerp primers

Doelsoorten per gecombineerde qPCR analyse:

A: (Roer) Brasem, Kopvoorn, Barbeel, Zalm, Zeeprik

B: (Mark en Vliet) Marmergrondel, Zwartbekgrondel, Rivierdonderpad, Winde

C: (beken bij Breda): Rivierdonderpad, Kleine modderkruiper, Kopvoorn en zoetwaterkreeftenfamilie *Cambaridae*

- Ontwerp optimale primers en probes
- Primerparen, probe evaluatie (temperatuurgradiënt)
- Selectiviteit (scheiding tussen doelsoort en niet gekozen vissoorten)
- Gevoeligheid (detectiegrens)
- Prestatie in combinatie met meerdere primer/probes (multiplex analyse)

Validatie qPCR in Vlaamse proefvijvers

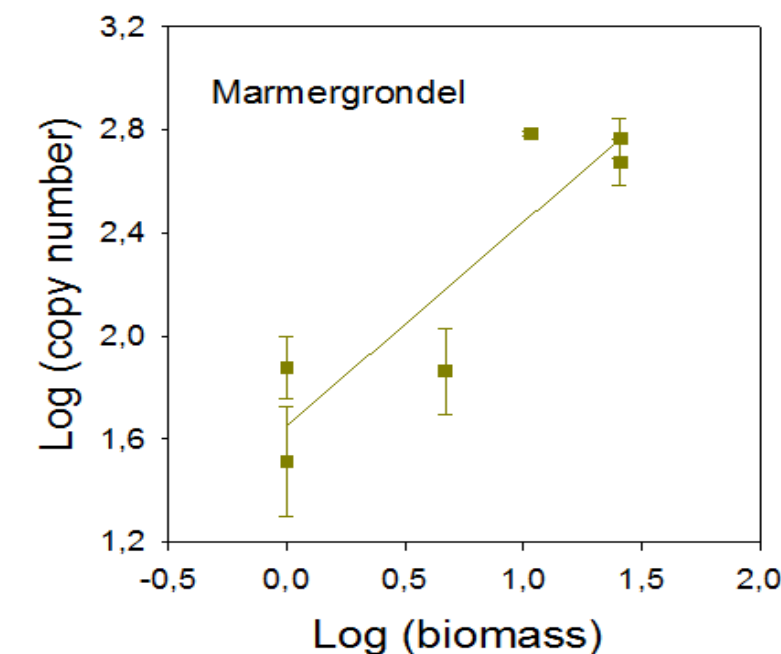
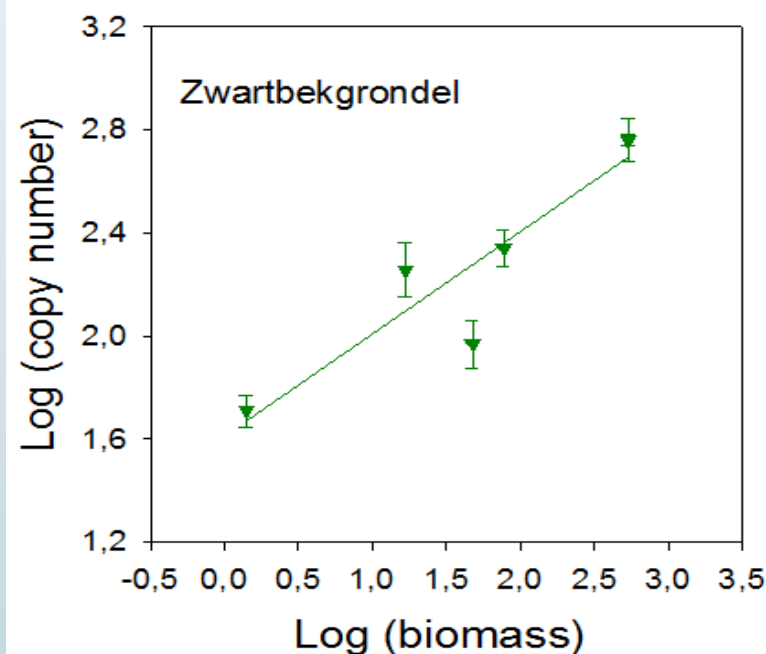
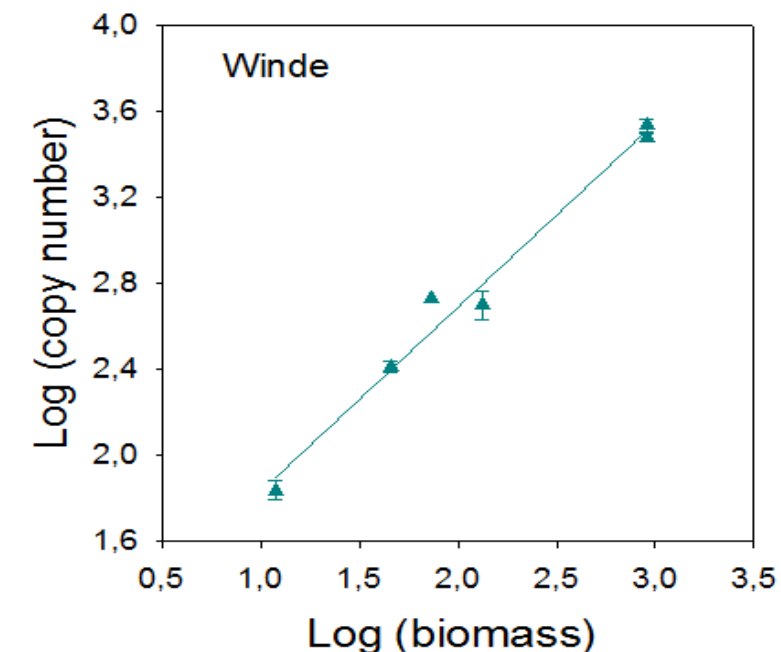
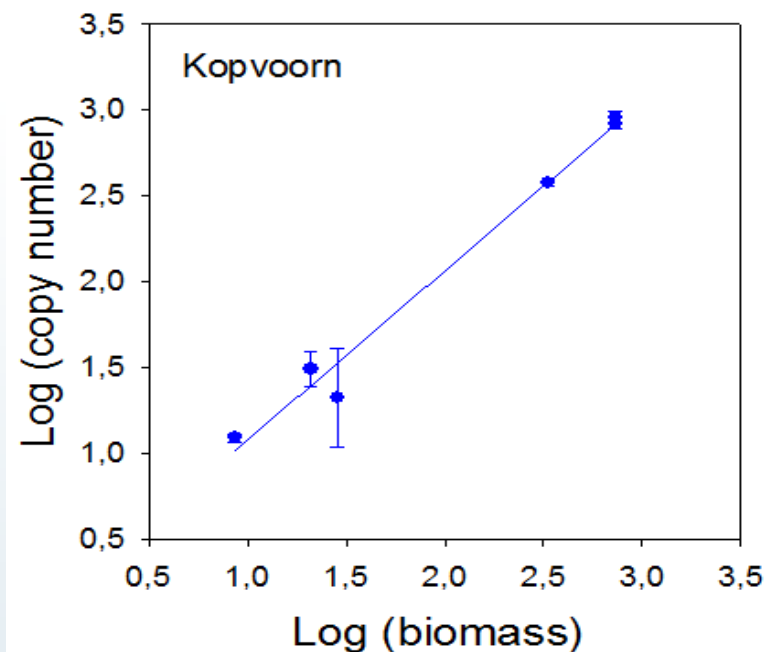
Met dank aan Rein Brys, INBO

- Zes mesocosms gevuld met 400 liter grondwater, 25 vissoorten in verschillende dichtheden per mesocosm
- Elk individu gewogen, daarna één week met rust gelaten
- Watermonsters door KWR in duplo geanalyseerd met de zeer gevoelige digital droplet qPCR analyse
- Doelsoorten: Kopvoorn, Winde, Zwartbekgrondel, Marmergrondel

Validatie qPCR in Vlaamse proefvijvers

Met dank aan Rein Brys, INBO

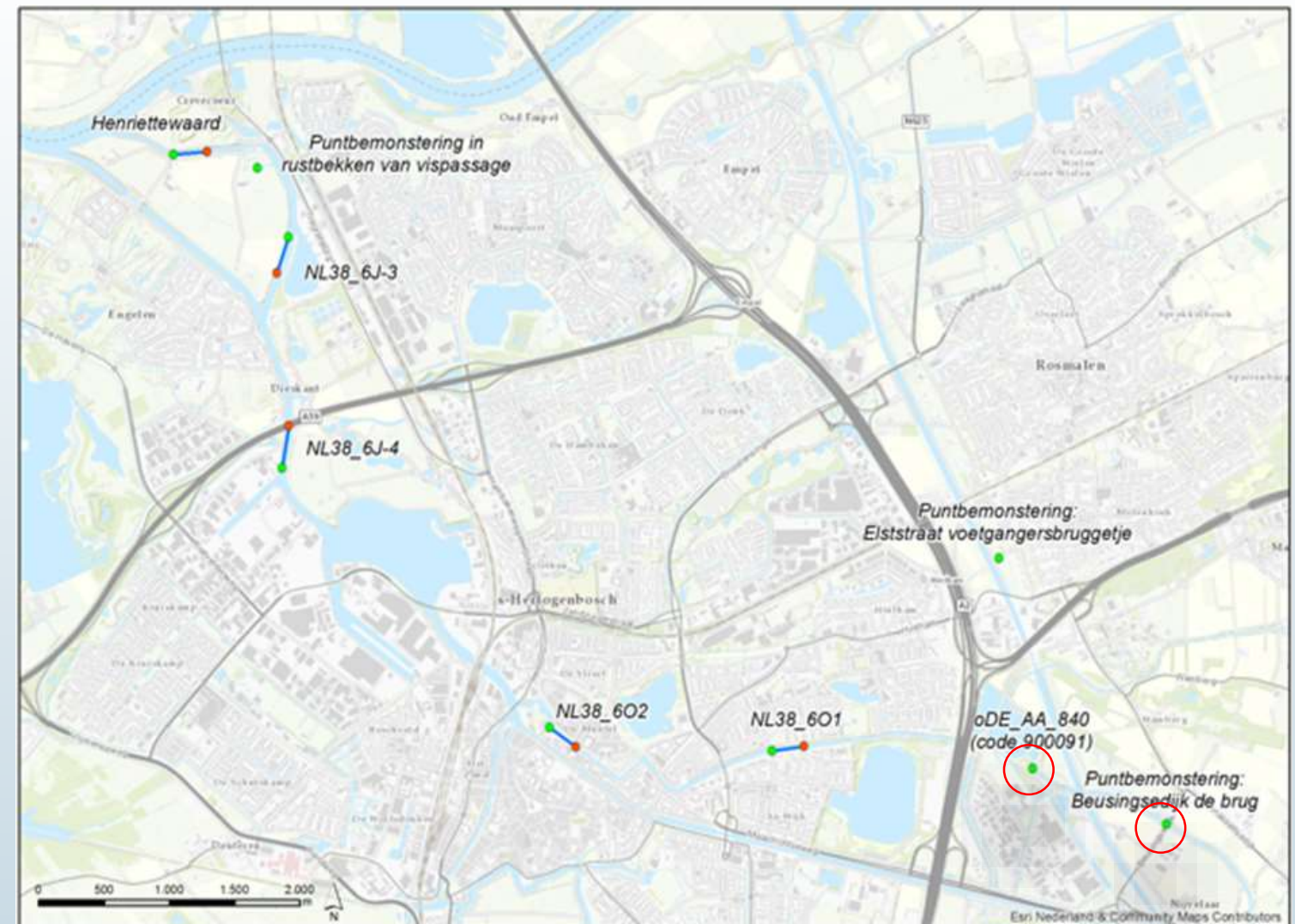
- Duidelijk lineair verband tussen qPCR waarden en biomassa's
- Dus een vertaling van DNA kopieën naar biomassa lijkt ruwweg mogelijk
- Maar: kleine of grote individuen kunnen niet worden onderscheiden



Aa en Maas


Metabarcoding: kwalitatieve verspreiding van soorten

- 9 NGS onderzoekslocaties in Stads Aa en Dieze (Den Bosch)
- 2 monsters te lage DNA opbrengst



Metabarcoding vs KRW bevissing

Soort	Elststraat voetgangersbruggetje	NL38_601	KRW	NL38_602	KRW	NL38_6J-4	KRW	NL38_6J-3	KRW	Vispassage HW	Henriettewaard
Alver											
Baars											
Bermpje											
Bittervoorn											
Blankvoorn											
Brasem											
Driedoornige stekelbaars											
Giebel/Goudvis											
Karper											
Kleine modderkruiper											
Kolblei											
Kopvoorn											
Marmer grondel											
Paling											
Pos											
Riviergrondel											
Roofblei											
Ruisvoorn											
Snoek											
Snoekbaars											
Tiendornige stekelbaars											
Vetje											
Winde											
Witvin grondel											
Zeelt											
Zwartbek grondel											
Aantal soorten	18	15	8	10	7	16	9	15	11	13	12

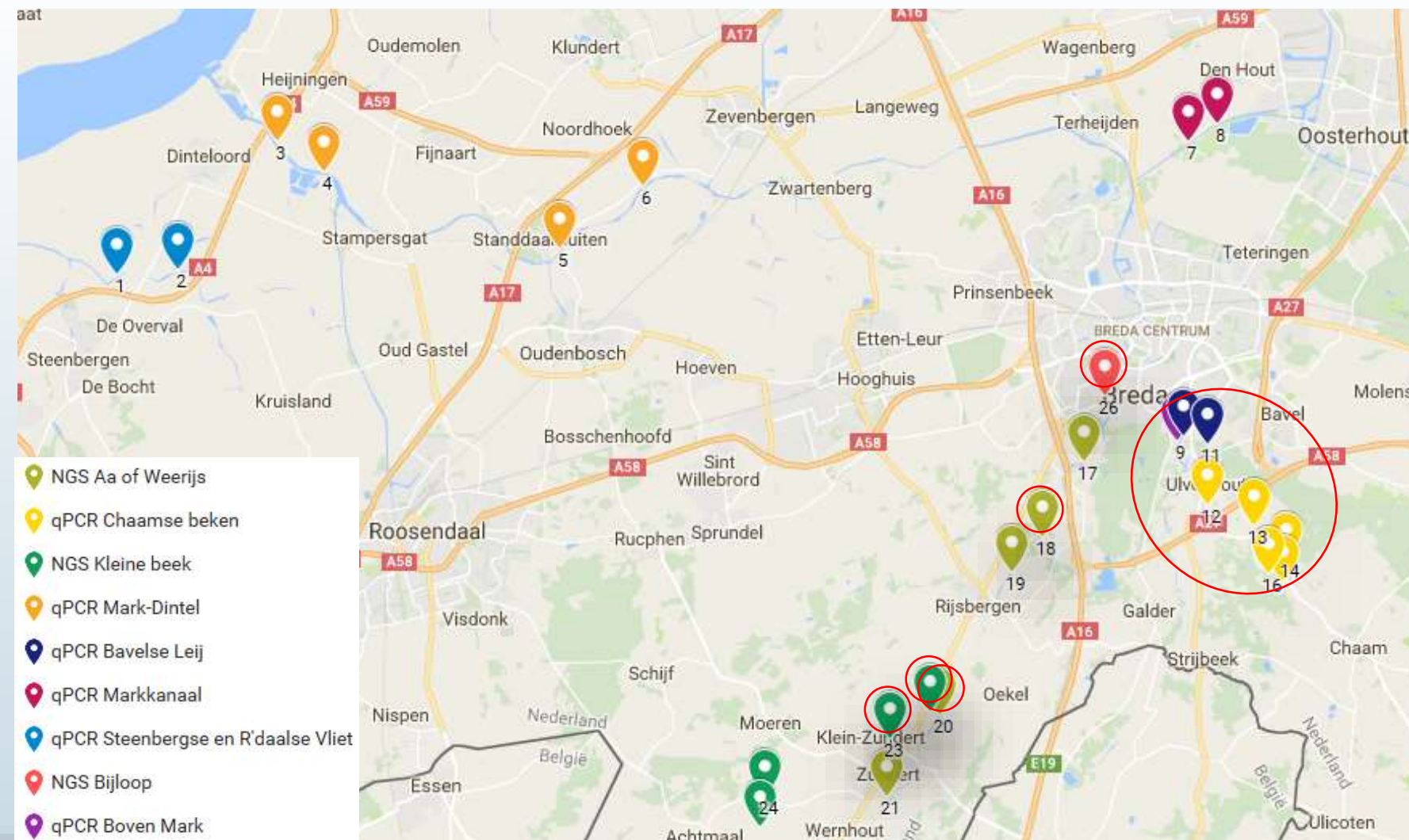
DNA kopieën	
	>10%
	1-10%
	<1%

	beide
	alleen NGS
	alleen KRW

Brabantse Delta

Metabarcoding: kwalitatieve verspreiding (10x)




qPCR: kwantitatieve verspreiding van soorten (16x)



- Opmerkelijk: 13 van de 18 monsters ten zuiden van Breda leverden te weinig eDNA op voor analyse

Metabarcoding vs KRW bevissing

Soort	Aa of weerijs (AW_ZT_H5)		Aa of weerijs (AW_WB_F8)		Aa of weerijs (AW_EW_C2)		Kleine Beek (KL_BA_C3)	Kleine Beek (KL_BL_B2)
		KRW		KRW		KRW		
Alver		x						
Baars		x				x		
Beekdonderpad								
Bermpje						x		
Bittervoorn						x		
Blankvoorn		x				x		
Blauwband						x		
Brasem		x				x		
Drie doornige stekelbaars								
Giebel/Goudvis								
Karper		x						
Kleine modderkruiper						x		
Kolbei		x				x		
Marmer grondel								
Paling								
Pos		x				x		
Riviergrondel		x				x		
Ruisvoorn		x				x		
Roofblei		x						
Snoek		x				x		
Snoekbaars		x						
Spiering								
Tien doornige stekelbaars								
Vetje						x		
Winde						x		
Zeelt		x				x		
Zonnebaars						x		
Zwartbek grondel								
Aantal soorten	16	13	17	15	15	16	20	19

DNA kopieën	
	>10%
	1-10%
	<1%

x	beide
	alleen NGS
x	alleen KRW

Metabarcoding langs de Roer, en 5 jaar vangsten ECI

Soort	Stroomopwaards →							DNA	ECI
	OROER905	OROER715	OROER550	OROER520	OROER440	OROER312	OROER195	tot	2009-2014
Alver									3016
Baars									72574
Barbeel									754
Beekdonderpad									542 ^a
Beekforel/Zeeforel/Bronforel									192+406+374 ^b
Bermpje									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
Marmergrondel									382
Meerval									48
Paling									3793
Pos									3353
Ruisvoorn									362
Rivierdonderpad									542 ^a
Riviergrondel									135
Rivierprik ^c									140
Roofblei									81
Serpeling									1125
Siberische steur ^c									12
Sneep									116
Snoek									96
Snoekbaars									816
Tien doornige stekelbaars									3
Vetje									9
Vlagzalm									6
Winde									116
Zalm									8235
Zeelt									85
Zeeprik ^c									64
Zonnebaars									120
Zwartbek grondel									2408
Aantal soorten	22	26	21	26	24	26	23	34	45

DNA kopieën	
	>10%
	1-10%
	<1%

	beide
	alleen ECI
	alleen NGS

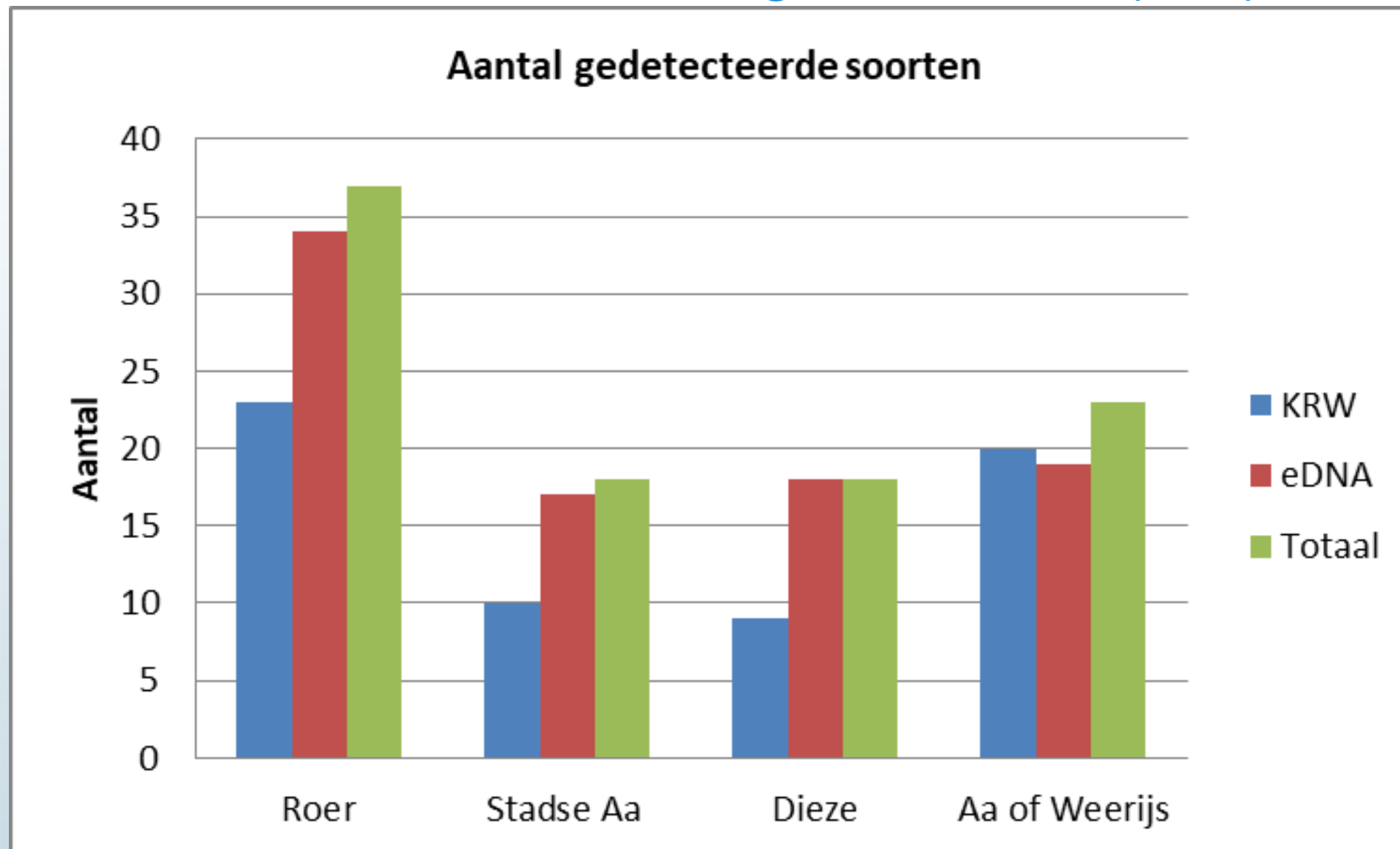
ECI geen onderscheid in beide donderpad soorten

NGS geen analyse prikken en steuren (3 soorten)

75% van alle ECI soorten in één dag met NGS gedetecteerd

Samengevat op waterlichaam niveau

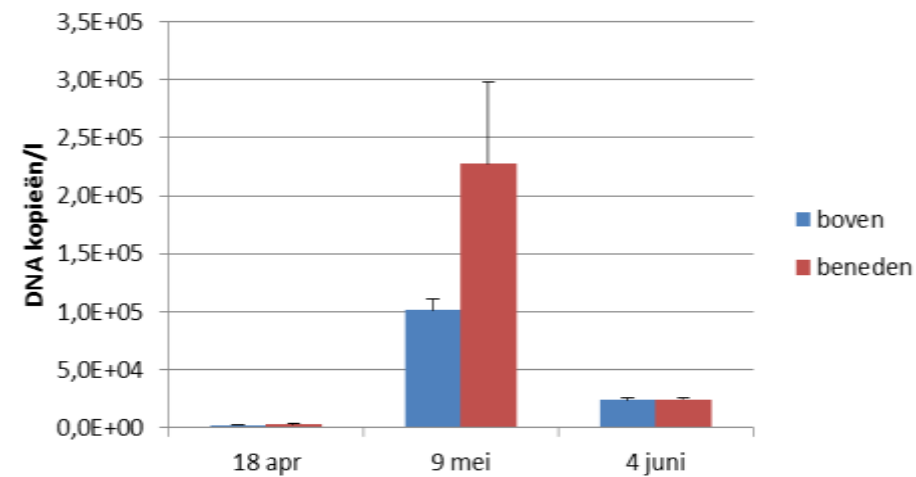
Soortenaantal met KRW bevissing en met eDNA (NGS)



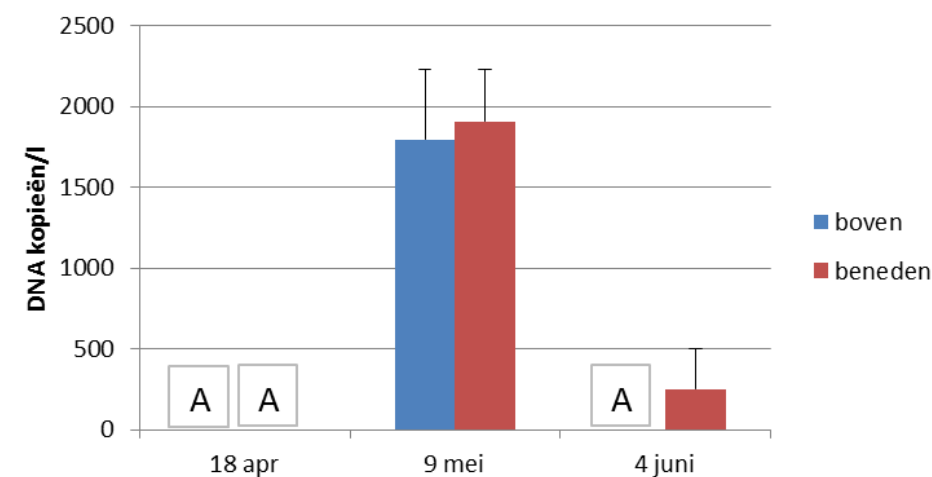
Waterschap Limburg

Identificeren van DNA dichtheid verschillen rond de ECI stuw (qPCR)

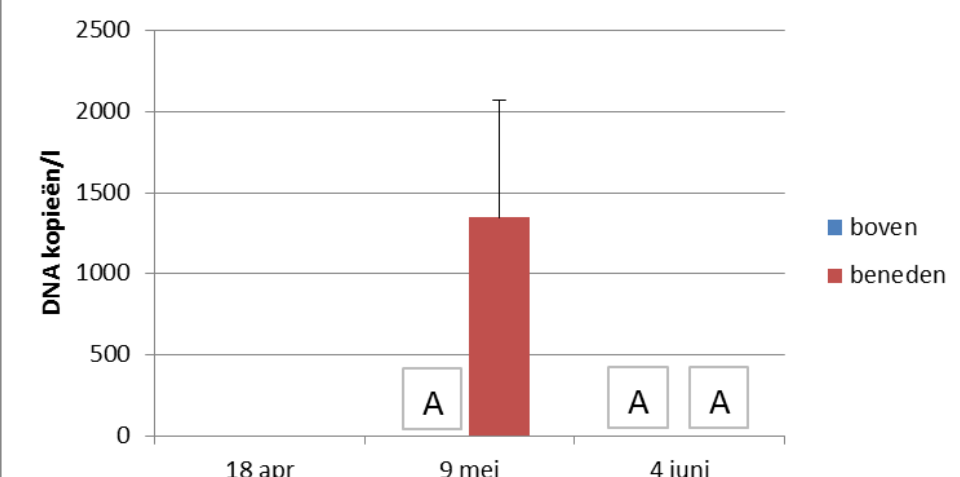
Brasem



Kopvoorn



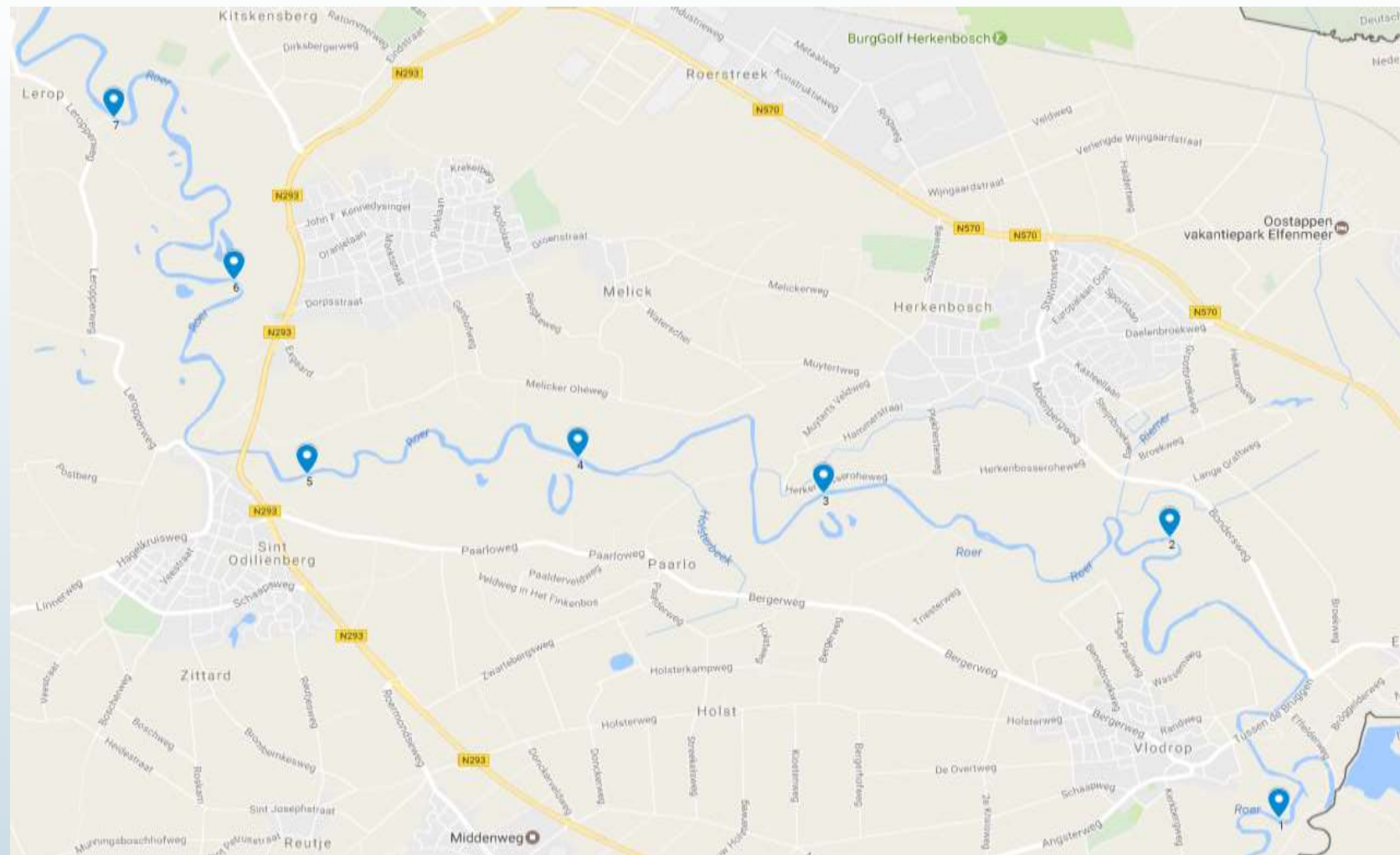
Barbeel



Zalm en Zeeprik niet aangetoond

Waterschap Limburg

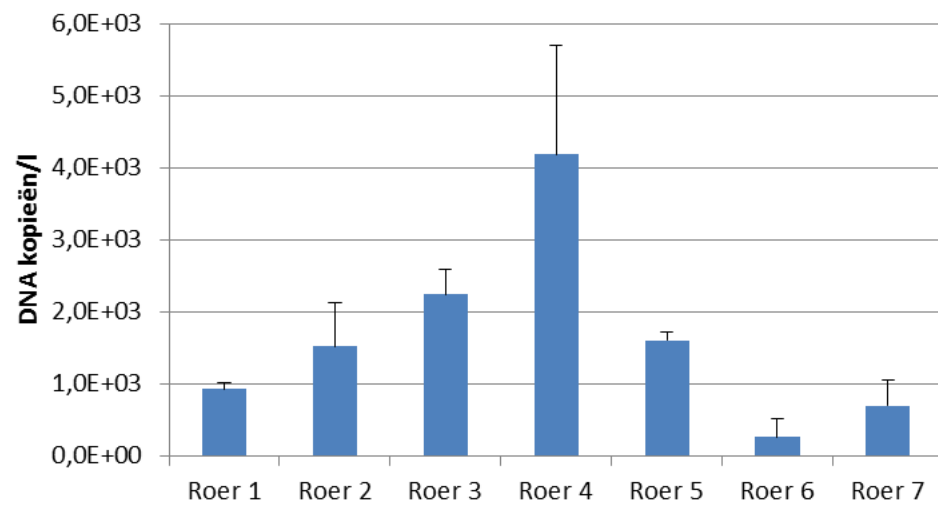
Kwantitatieve verspreiding van doelsoorten (qPCR)



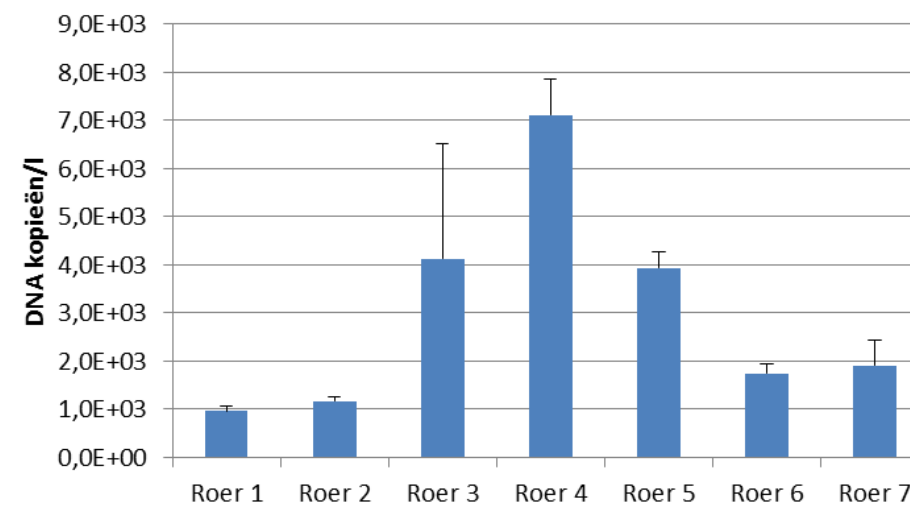
Waterschap Limburg

Kwantitatieve verspreiding van doelsoorten (qPCR)

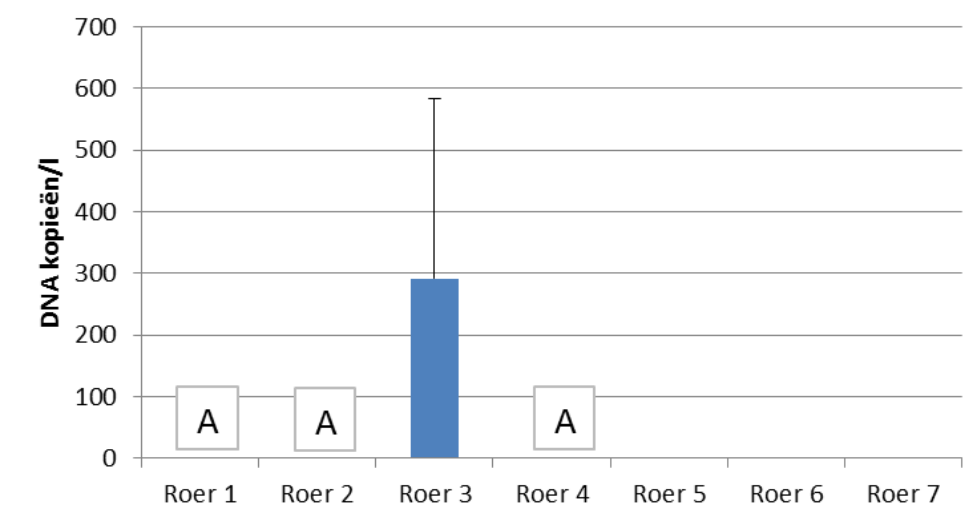
Brasem



Kopvoorn



Barbeel



Zalm en Zeeprik niet aangetoond

Conclusies

- Metabarcoding: NL-Vispopulatiescan operationeel
 - Groot onderscheidend vermogen
 - Reproduceerbaar, lage detectiegrens (5 DNA kopieën/5 µl, gevalideerd met ddPCR)
- Kwantitatieve qPCR-methoden ontworpen en gevalideerd (multiplex)
 - Brasem, Kopvoorn, Barbeel, Zalm, Zeeprik, Marmergrondel, Zwartbekgrondel, Rivierdonderpad, Winde, Kleine modderkruiper, Amerikaanse zoetwaterkreeften *Cambaridae*
 - qPCR resultaat vertoont goede relatie met biomassa voor 4 geteste soorten
- Goede ervaring met bemonsteringsprotocol, bewaren en transport van watermonsters in centrifugebuizen
- DNA extractie-rendement $\frac{3}{4}$ van de locaties goed, maar niet voor deel watermonsters ten zuiden van Breda en 2 locaties bij Den Bosch; filtratie is robuust gebleken maar vergt snel (24 uur) transport en verwerking door lab

Tenslotte: heel veel dank aan onze samenwerkingspartners!

- Guido Atsma (Aa & Maas)
- Marco Beers (Brabantse Delta)
- Rob Gubbels & Harry Tolkamp (Waterschap Limburg)
- Tim Puts (Witteveen+Bos)
- Igor Spierts (ATKB)
- Tom van den Bogert (Baseclear)

Verder lezen in het rapport:

<https://library.kwrwater.nl/publication/56006895>

Wordt vervolgd....
Bedankt voor je aandacht!



@KWR_Water