

Nanopore-sekvensering:

eDNA og Dansk Vandløbs Fauna
Indeks (DVFI)

Martin Hesselsøe, NIRAS A/S

Ph.D. Markedschef for Natur & Biodiversitet

*Biodiversitetssymposiet, Århus Universitet
25. September 2024*



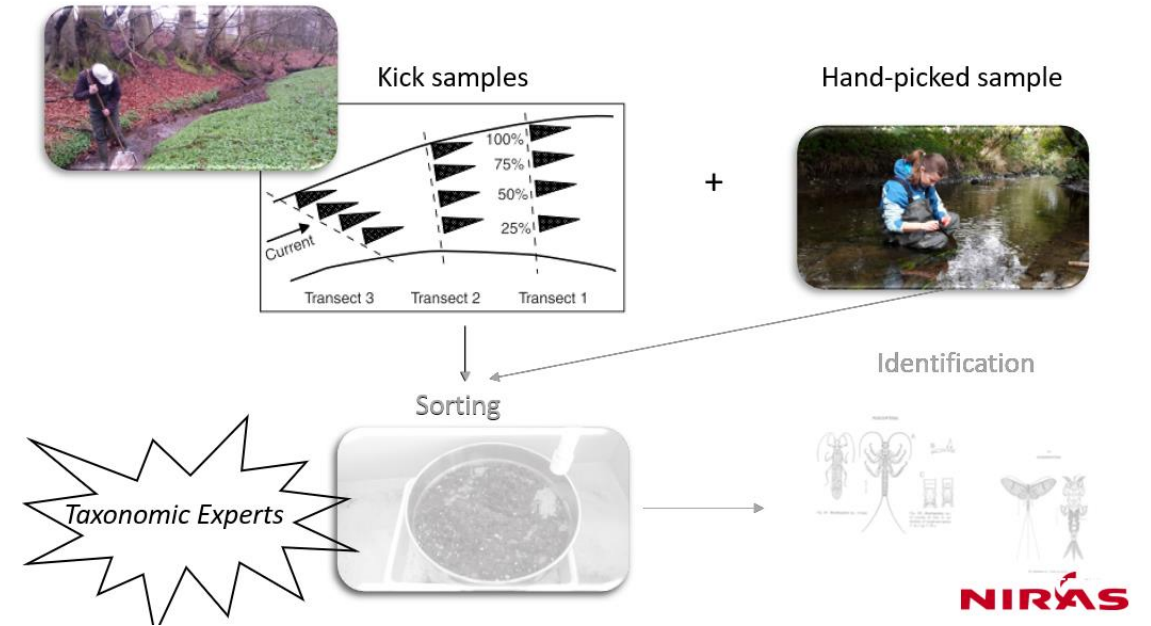
Dansk Vandløbs Fauna Indeks DVFI:

BQE: makroinvertebrater

Skalaen for faunaklasser

Figur 3: Her kan du se sammenhængen mellem faunaklasse (DVFI) og vandløbets tilstand.

	Faunaklasse	Tilstand
	FK 7	Høj
	FK 6	Høj/god
	FK 5	God
	FK 4	Moderat
	FK 3	Moderat/ringe
	FK 2	Ringe/dårlig
	FK 1	Dårlig



"DNA-DVFI" Tidligere arbejde:

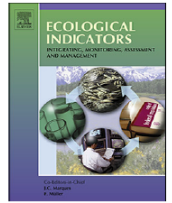
Ecological Indicators 111 (2020) 105982



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind



Original Articles

Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates

Franziska Kuntke^{a,b,1}, Nadieh de Jonge^{a,1}, Martin Hesselsøe^{b,c}, Jeppe Lund Nielsen^{a,*}

^a Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Fredrik Bajers Vej 7H, DK-9220 Aalborg East, Denmark

^b Amphi Consult ApS, Niels Jernes Vej 10, DK-9220 Aalborg East, Denmark

^c NIRAS A/S, Østre Havnegade 12, DK-9000 Aalborg, Denmark



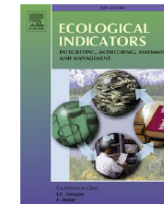
Ecological Indicators 130 (2021) 108059



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind



Ecological quality in freshwater streams is reflected across all three domains of life

Nadieh de Jonge^{a,b}, Franziska Kuntke^{a,c}, Martin Hesselsøe^{b,c}, Jeppe Lund Nielsen^{a,*}

^a Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Fredrik Bajers Vej 7H, DK-9220 Aalborg East, Denmark

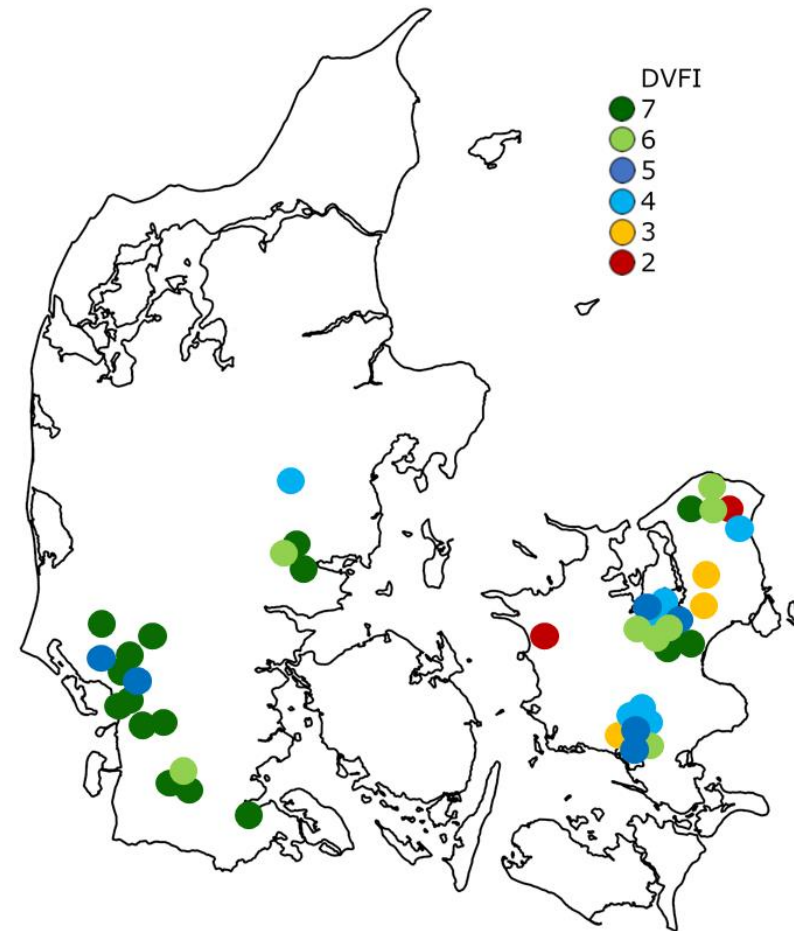
^b NIRAS A/S, Østre Havnegade 12, DK-9000 Aalborg, Denmark

^c Amphi Consult ApS, Niels Jernes Vej 10, DK-9220 Aalborg East, Denmark

DNA-DVFI

Resultater fra erhvervs ph.d. projekt:

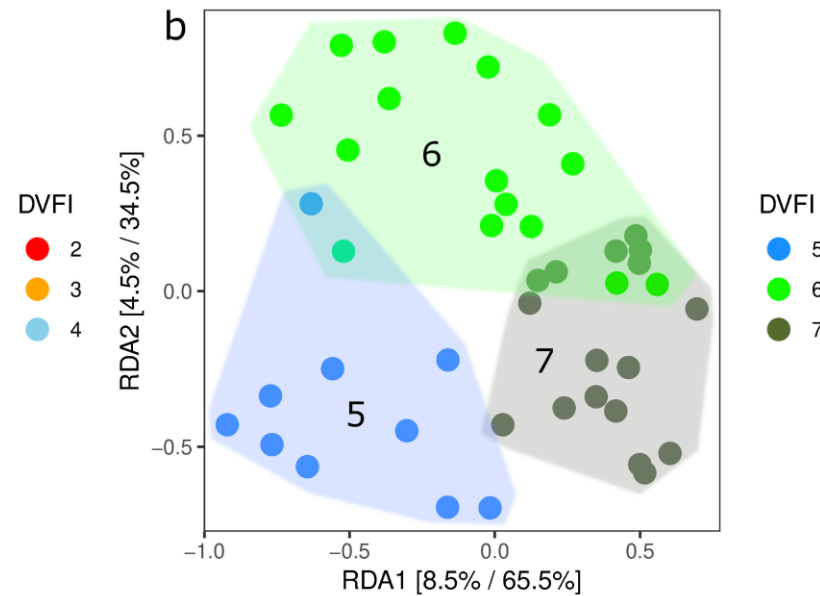
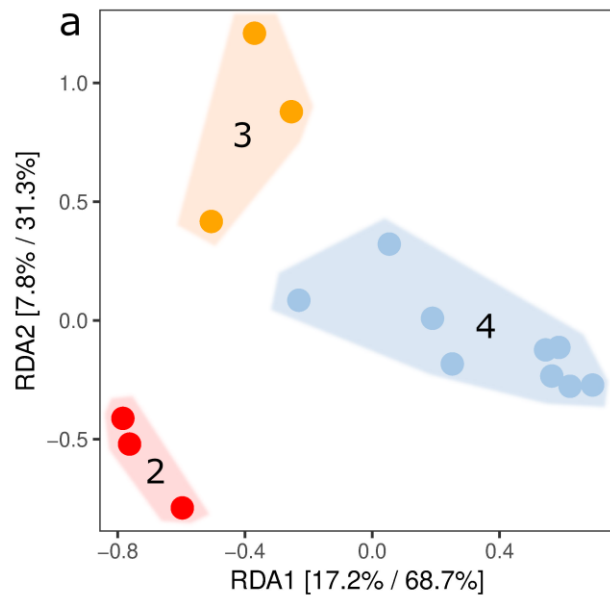
- 53 danske vandløb
- Parallel prøvetagning til konventionelt og DNA-DVFI
- Metabarcoding baseret på markør til invertebrater
- Sekvensering baseret på Illumina teknologi



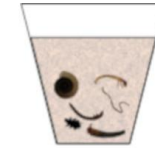
DNA-DVFI

Resultater fra erhvervs ph.d. projekt:

- DNA-sekvenser fra vandløbene grupperer sig efter DVFI



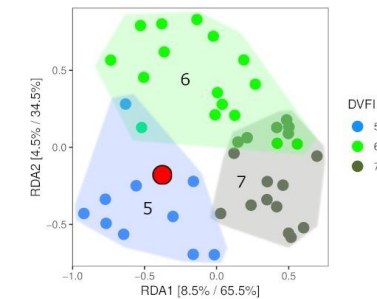
1. Fauna prøve ● med ukendt DVFI fra vandløb



2. Homogenisering



3. DNA ekstraktion
4. Metabarcoding
5. Multivariat analyse



Konklusion: Den ukendte prøve ● tilhører DVFI 5

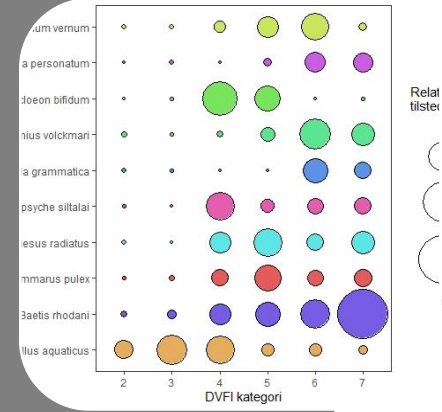
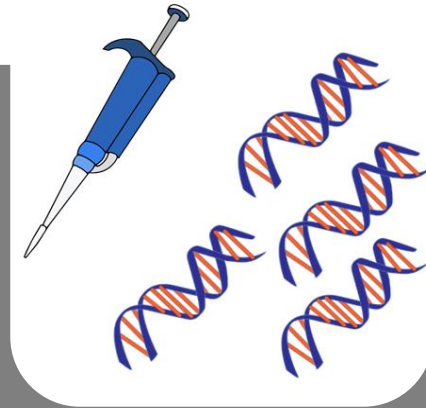
Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA



AALBORG UNIVERSITET



Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA



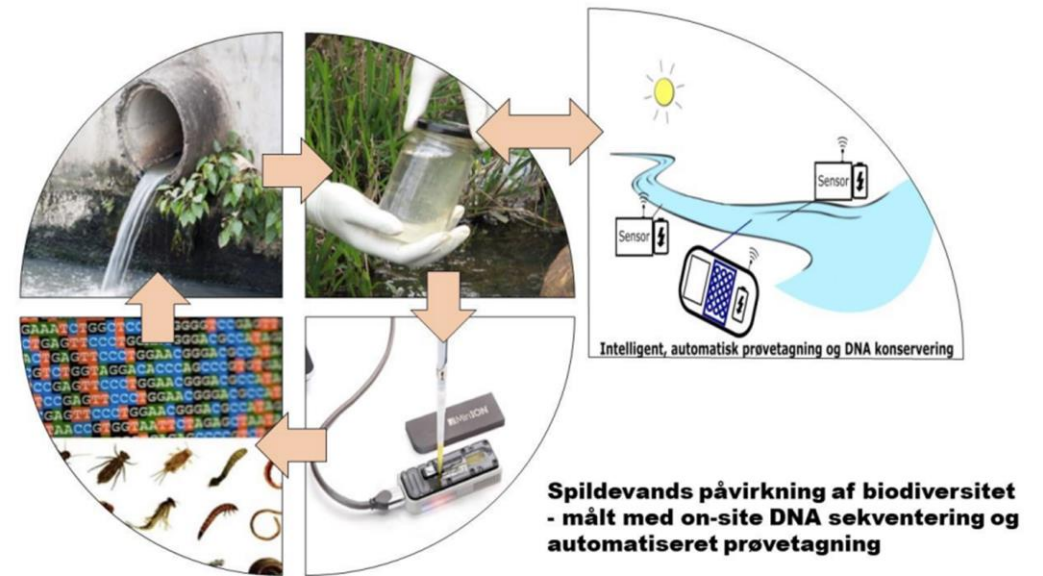
MinION is the only portable, real-time device for DNA and RNA sequencing, putting you in control of your sequence data.



Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA

Projektets formål:

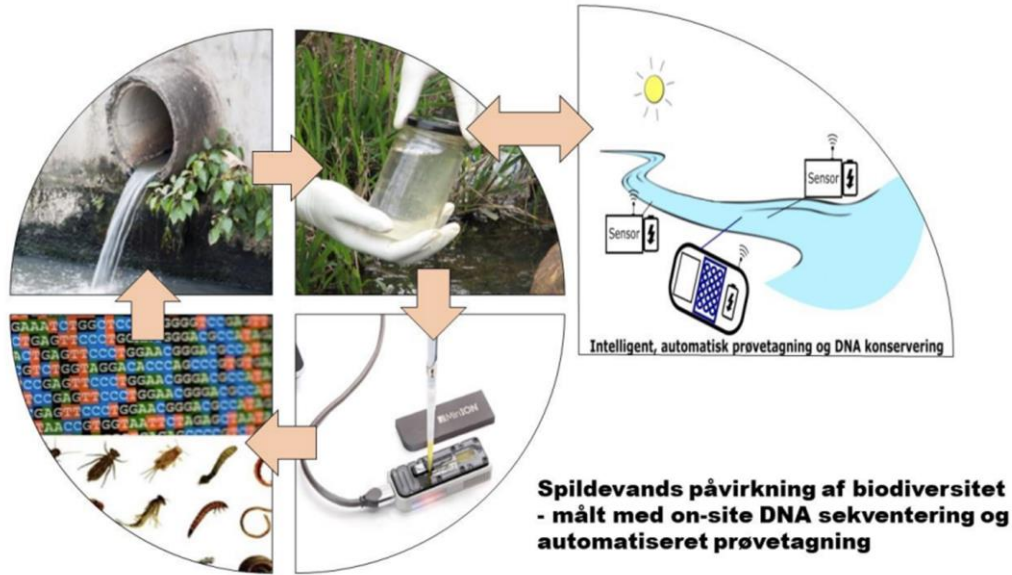
- Forsyningsvirksomheder (FV) opsamler, transporterer, renses og udleder spildevand fra husholdninger, veje og industri.
- Udledning af opsamlet, renseset og urenseset spildevand udgør en påvirkning af natur og biodiversitet i vandområder.
- Vandrammedirektivet kræver "god økologisk tilstand" i naturlige vandområder.
- Effektive overvågningsmetoder er afgørende for at minimere påvirkning fra spildevand på natur og biodiversitet.
- Vi udvikler og tester nyt udstyr til (a) on-site DNA analyse og (b) automatisk og intelligent prøvetagning.
- Dette kan bruges til at undersøge, dokumentere og minimere påvirkning af biodiversitet i vandmiljøet fra FV's udledninger af spildevand.



Figur 1: Spildevands påvirkning af biodiversitet - målt med on-site DNA sekventering og automatiseret prøvetagning. Prøverne udtages enten manuelt, eller med automatisk intelligent prøvetagningsudstyr. Efterfølgende sekventeres DNA ved hjælp af Nanopore teknologi. DNA sekvenserne oversættes til sammensætningen af de udvalgte biologiske kvalitetsselementer (fx makroinvertebrater). Sammensætning og biodiversitet anvendes til at vurdere økologisk tilstand. Resultaterne kan anvendes til at justere udledningstilladelser og udledningerne, med henblik på at reducere påvirkning af natur og biodiversitet. Denne cykliske arbejdsgang fortsættes til der opnås "god økologisk tilstand" i henhold til vandrammedirektivets krav.

Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA

Projektets formål:



Figur 1: Spildevands påvirkning af biodiversitet - målt med on-site DNA sekventering og automatiseret prøvetagning. Prøverne udtages enten manuelt, eller med automatisk intelligent prøvetagningsudstyr. Efterfølgende sekventeres DNA ved hjælp af Nanopore teknologi. DNA sekvenserne oversættes til sammensætningen af de udvalgte biologiske kvalitetselementer (fx makroinvertebrater). Sammensætning og biodiversitet anvendes til at vurdere økologisk tilstand. Resultaterne kan anvendes til at justere udladningstilladelser og udledningerne, med henblik på at reducere påvirkning af natur og biodiversitet. Denne cykliske arbejdsgang fortsættes til der opnås "god økologisk tilstand" i henhold til vandrammedirektivets krav.

- Udvikling af en DNA-metode med udgangspunkt i (DNA)-DVFI. Andre potentielle biologiske kvalitetselementer (BQE) inddrages.
- For at kunne prioritere indsats mod overløb ønsker ENVAFORS en metode til hurtigt at kunne vurdere effekten på biodiversitet af spildevandsoverløb til vandløb.
- Metoden skal derfor -på sigt- kunne anvendes i ENVAFORS egne laboratorier.
- I tillæg udvikles og testes udstyr til automatiseret og intelligent DNA-prøvetagning af vandprøver, baseret på bestemte hændelser, der potentielt kan påvirke vandløbet

Sekvenseringsplatforme til eDNA Metabarcoding

Illumina MiSeq vs. Oxford Nanopore Technology (ONT) Minlon

- Dyrt udstyr
 - Kræver professionelt laboratorium
 - Bedst til korte DNA-fragmenter
 - Hurtigere end Minlon (flere sekvenser)
 - Lav fejlrate
- Billigt udstyr
 - Kan potentielt implementeres i mindre laboratorier
 - Bedst til lange DNA-fragmenter, men kan uden problemer bruges ned til ca. 100 bp.
 - Langsommere end MiSeq (færre sekvenser)
 - Tidligere høj fejlrate - er ikke længere et problem



Sekvenseringsplattforme til Metabarcoding

Illumina MiSeq vs. Oxford Nanopore Technology (ONT) Minlon



- Raw data quality is > Q20 now.
- With relatively basic bioinformatic treatment, “Illumina quality” data (Q30) is now easy to achieve.
- Source : Nanoporetech.com



Comparing the accuracy and efficiency of third generation sequencing technologies, Oxford Nanopore Technologies, and Pacific Biosciences, for DNA barcode sequencing applications

Piotr Cuber ^a, Darren Choonee ^{a,1}, Clementine Geeves ^{a,2}, Silvia Salatino ^a, Thomas J. Creedy ^{a,b}, Claire Griffin ^a, Laura Sivess ^b, Ian Barnes ^b, Ben Price ^b, Raju Misra ^a

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.egg.2023.100181>

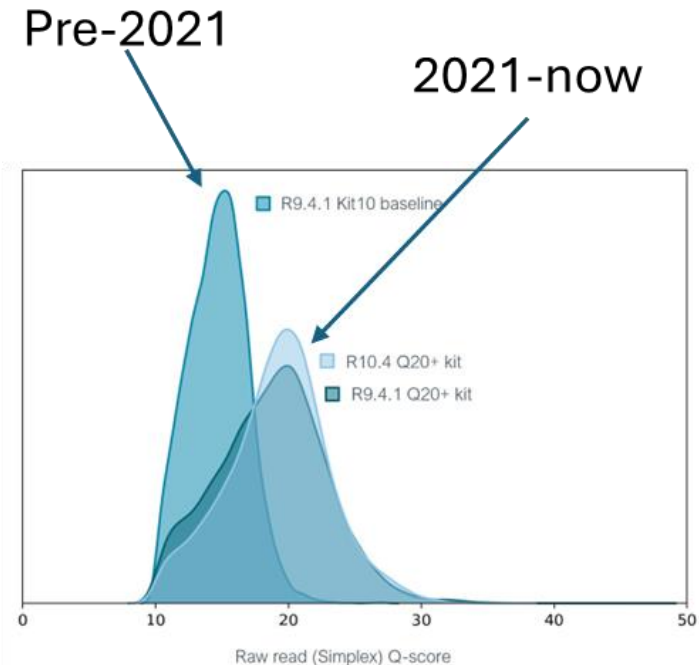
Get rights and content

Under a Creative Commons license

open access

Abstract

New genomic technologies, such as third generation sequencing (TGS), have enabled for high-throughput, rapid, and cost-effective data generation of non-model organisms, accelerating taxonomic identification studies and contributing to conservation applications. Here, we present the first comparison of the two leading TGS providers, Pacific Biosciences (PacBio) and Oxford Nanopore Technologies (ONT), for the purpose of DNA barcoding, using morphological identification and Sanger sequencing as the reference. We demonstrate that the highest numbers of successfully sequenced samples were achieved with the ONT R10 & Q20+ chemistry combination. In terms of library preparation time, ONT protocols were the quickest. Compared to Sanger sequencing, we estimate that third-generation platforms become more cost-effective when a study requires the barcoding of more than 61 (Flongle), 183 (MiniON), or 356 (PacBio) samples. Although both tested platforms are suitable for DNA barcoding, both had limitations, and applicability to different studies. The pipeline we have developed, which goes from whole specimens to final DNA barcode sequences, can aid planning and budgeting for biodiversity studies, maximising the number of specimens sequenced in one run and speeding up sample processing time.

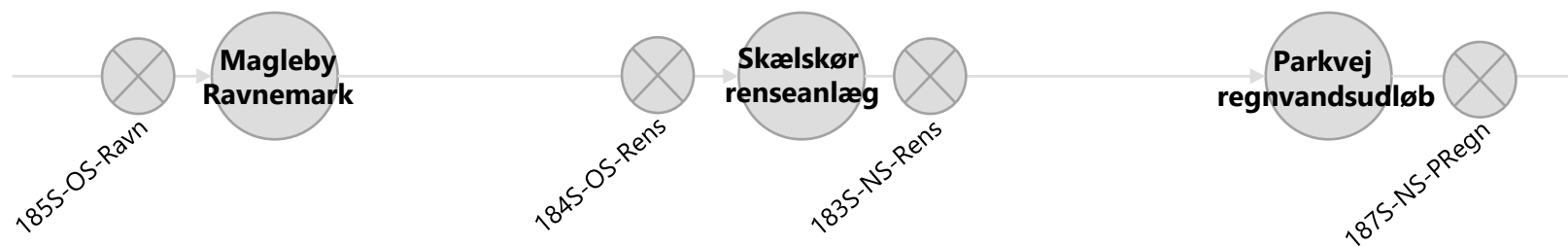


<https://doi.org/10.1016/j.egg.2023.100181>

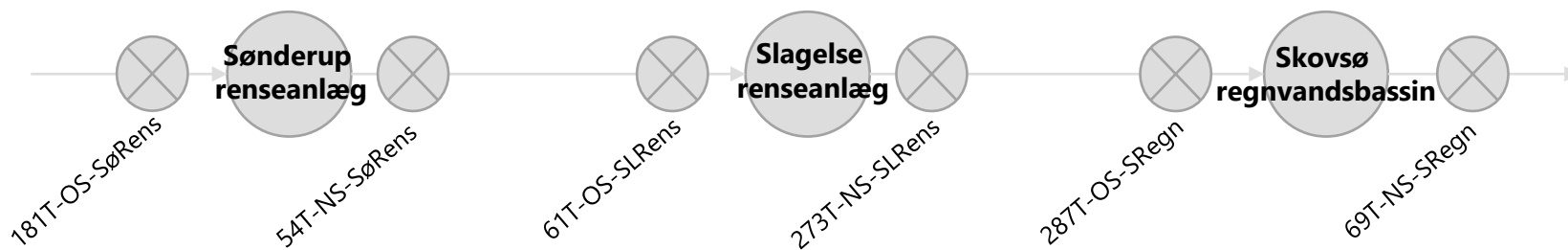
Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA

Stationsoversigt vandløb i Slagelse Kommune - skematisk:

Spegerborgrenden



Tude Å / Skovsø Å



Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA

Prøvetyper:

- Prøver indsamlet på 10 stationer
- 8 indsamlinger fordelt over 1 år.
- Konventionel DVFI
- Filtreret vandprøve (DNA-sekvenseret)
- DNA sekvenseret faunaprøve
- 10x8x2 = ca. 160 DNA sekvenseringer
- 80 konventionelle DVF analyser



Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA

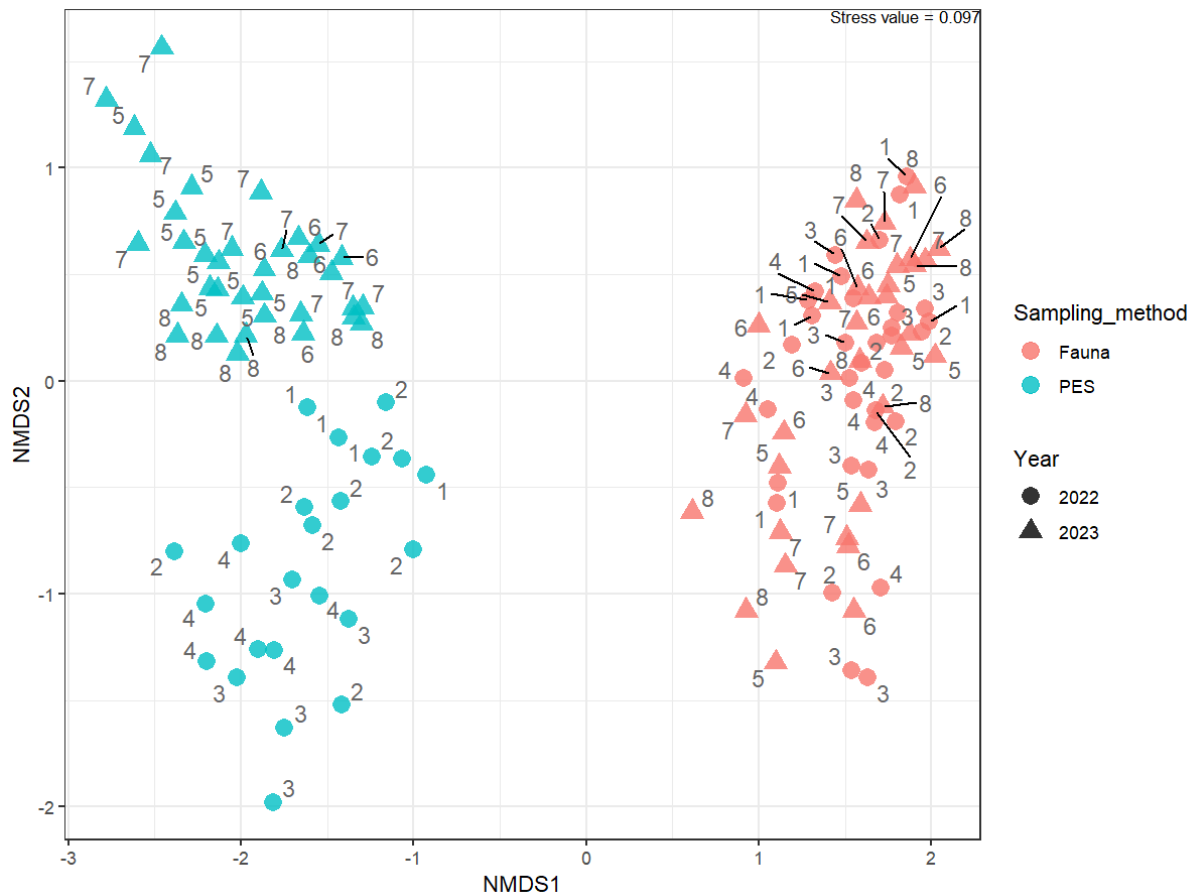
Resultater:

	Antal grupper	% overlap
DVFI	138*	
DNA-DVFI - F	74	54%
DNA-DVFI - V	25	18%

- Der blev fundet 168 grupper med relevans for DVFI i de konventionelle undersøgelser. Heraf 30 grupper ikke sammenlignet på grund af manglende DNA-data
- I faunaprøverne ses en sammenhæng mellem antal individer fundet i den konventionelle analyse, og "Read Abundance" i DNA-DVFI
- DNA-DVFI finder flere DVFI-relevante organismer, som ikke blev fundet i den konventionelle analyse
- Overlap bedst inden for EPT-arter (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera). Dog meget få slørvinger (Plecoptera) i datasættet.

Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA

Resultater:



- Stor forskel i DNA- sekvenser mellem vand- og faunaprøver
- DNA-DVFI (baseret på faunaprøver) kan forudse faunaklasse for vandløb. Nu også med nanopore sekvensering.
- DNA analyse af vandprøver kan ikke sammenlignes direkte med med faunaprøverne.
- Muligheder for at anvende DNA-data fra vandprøver undersøges stadig (in progres).
- Protokol for Nanopore sekvensering er under implementering i ENVAFORS laboratorium til brug for fremtidig egenkontrol (in progres).

Spildevands påvirkning af biodiversitet – Målt med eDNA



Kontakt:



Søren Bastholm Olesen
SBO@dmr.dk



Nadieh de Jonge: ndj@bio.aau.dk
Jeppe Lund Nielsen: jln@bio.aau.dk



Natascha Koch Larsen
natlar@envafos.dk



Martin Hesselsøe, MHES@niras.dk
Trine B Nicolajsen, TBNI@niras.dk

