

Meelifters bij glasaaluitzettingen in Nederland

In opdracht van Bureau Risicobeoordeling & onderzoek,
Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit



A. Gittenberger
H. Keeler Perez
M. Rensing



GiMaRIS rapport 2023_13

Datum:
december 2023

Rapport nr.:
GiMaRIS 2023_13

Titel:
Meelifters bij glasaaluitzettingen in Nederland

Auteurs:
Dr. A. Gittenberger
H. Keeler Perez MSc.
Drs. M. Rensing

Adres / opdrachtnemer:
GiMaRIS
Rijksstraatweg 75
2171 AK Sassenheim
Info@GiMaRIS.com
www.GiMaRIS.com

In opdracht van:
Bureau Risicobeoordeling & onderzoek, Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit

GiMaRIS is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit de toepassing van de gegevens in dit rapport. De opdrachtgever vrijwaart GiMaRIS voor aanspraken van derden in verband met de gegevens in dit rapport. Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag worden weergegeven, gepubliceerd, gekopieerd of op enige andere manier gebruik worden zonder schriftelijke toestemming van de auteur of de opdrachtgever. Het kwaliteitsmanagementsysteem van GiMaRIS is NEN-EN-ISO 9001:2015 gecertificeerd door NCK voor het Nationaal en Internationaal plegen van onderzoek, het geven van adviezen en beleid maken voor bedrijven, semioverheid en overheid (NCK.2015.364.ISO9001). GiMaRIS is lid van het Netwerk Groene Bureaus (NGB).



1. Inleiding

In 2018 is er voor Bureau Risicobeoordeling & onderzoek (BuRO) van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) een gevaaren inventarisatie en risicoschatting uitgevoerd gericht op “Exoten in de visketen” (Gittenberger *et al.*, 2018). Deze studie gaf aan dat vissen en andere dieren die van oorsprong niet in Nederland voorkomen, in ons land terecht kunnen komen door mee te liften met vissen die door de mens worden uitgezet. Introducties van exoten kunnen hierbij grote gevolgen hebben voor lokale ecosystemen en de inheemse biodiversiteit. Hoewel er diverse voorbeelden bekend zijn uit het buitenland, bleek relatief weinig bekend over introducties via visuitzettingen in de Nederlandse wateren.

Om meer inzicht te krijgen over dergelijke (onopzettelijke) introducties via visuitzettingen, heeft BuRO opdracht gegeven voor de hier beschreven studie uitgevoerd door GiMaRIS. Deze studie richt zich op het mariene milieu.

De voornaamste visuitzettingen die in het mariene milieu plaats vinden (bijvoorbeeld in de Grevelingen en het Veerse Meer), betreffen uitzettingen van glasalen afkomstig uit Zuidwest Europese wateren. Glasalen vormen dan ook de focus van de studie uitgevoerd in 2023. Hierbij zijn ook resultaten van een bemonstering in 2022 meegenomen. Toen zijn in opdracht van BuRO glasalen bemonsterd die illegaal vervoerd werden in koffers. Deze glasalen, die bij Schiphol in beslag zijn genomen, kwamen vermoedelijk uit Portugal. Nadat de glasalen in Harderwijk in zoetwater bassins in leven werden gehouden, werd een visuele inventarisatie uitgevoerd, gericht op het detecteren van organismen die mogelijk mee waren gelift. Hierbij werden meerdere individuen van de vlokreeft *Gammarus chevreuxi* aangetroffen, een voor Nederland uitheemse brakwater vlokreeft die oorspronkelijk voorkomt langs de ZW Europese kust (langs de Franse kust tot in Het Kanaal en

langs de ZW kusten van de Britse eilanden). In Nederland werd deze soort nog niet levend waargenomen. Hoewel er bij de glasalen geen levende individuen werden aangetroffen, is het onduidelijk of de individuen wel levend waren toen ze nog in de koffers zaten. Het betreft immers een soort die in brakwater leeft en de overgang naar het zoete water in het bassin van Harderwijk mogelijk niet kan overleven. Aangezien *G. chevreuxi* een voor ZW Europa inheemse soort is die tot in Het Kanaal voorkomt (<https://www.gbif.org/species/2219849>), kan deze soort van nature de Nederlandse wateren ook bereiken. Hij heeft zich in Nederland vermoedelijk nog niet gevestigd omdat het klimaat ongeschikt is. Mocht het Nederlandse klimaat vanwege klimaatverandering, beter geschikt worden, dan zal hij zich mogelijk wel vestigen. Soorten waarbij het verspreidingsgebied vanwege klimaatverandering binnen Europa naar het noorden opschuift, worden niet gezien als exoten omdat ervan uit wordt gegaan dat deze uitbreiding gebeurt via natuurlijke verspreiding.

Waar de bemonstering in 2022 gebaseerd was op een illegaal transport, werden de bemonsteringen in het voorjaar van 2023 uitgevoerd bij legale uitzettingen van glasaal geïmporteerd uit Frankrijk. Dit gebeurt ter ondersteuning van de paling populatie in Nederland in het kader van de “EU eel regulation” (https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/ocean/marine-biodiversity/eel_en).

De vragen waar dit onderzoek zich op richt, zijn:

- [1] Welke soorten organismen liften naar Nederland mee met glasaaltransporten uit Zuid Europa?
- [2] In hoeverre is het de verwachting dat deze soorten een impact zouden kunnen hebben op de Natura2000 waardes van mariene wateren zoals de Grevelingen en het Veerse Meer, indien de glasalen daar waren uitgezet?
- [3] Met welke maatregelen zou een eventuele impact beperkt kunnen worden?

2. Methode

2.1 Inspectie in het veld

De inspectie van het glasaaltransport vond plaats op 10 maart 2023 vanaf 7:00 in Huizen aan het Gooimeer. Gekoelde piepschuim boxen met elk ~2,5 kg glasaal werden direct na aankomst met een vrachtwagen uit Frankrijk, in Huizen verdeeld over verschillende auto's. Ze werden vervolgens uitgezet verspreid over de Randmeren: Zuidelijke Randmeren, Veluwe Randmeren en Kadoelmeer / Vollenhovermeer. In het gebied tussen Veluwe Randmeer en Kadoelmeer (Vossenmeer, Ketelmeer, Zwartmeer) zijn geen glasalen uitgezet. Het betrof in totaal ongeveer 800 kilo glasaal, met een gemiddeld gewicht van 0,46 gram. Zo werden er naar schatting 1,73 miljoen individuen uitgezet.

De glasalen zagen er gezond uit, waarbij er slechts enkele dode individuen bij zaten. Twee piepschuim boxen werden visueel doorzocht op meeliftende soorten direct na aankomst van de vrachtwagen. Met meeliftende soorten worden alle dier- en plantensoorten bedoeld die levend kunnen meekomen met het transportwater waarin de glasalen zich bevonden. De inspectie vond plaats op de kade naast het water op een tafel met bakken verlicht door daglicht lampen. Het doorzoeken werd gedaan door kleine hoeveelheden glasaal met water vanuit een piepschuim box in een zwarte ondiepe bak te gieten. Als er weinig water bij zat, werd er wat buitenwater bijgegoten om het zoeken makkelijker te maken. Om vervuiling te voorkomen, werd dit buitenwater water eerst met een klein zooplankton-net (maaswijdte 100 μm) gefilterd. Vervolgens werden alle organismen verzameld die bij de glasalen zichtbaar waren. Dode organismen werden geconserveerd op 96% ethanol voor DNA-analyses. Levende organismen werden in 50 ml buizen verzameld samen met het water dat in de piepschuimen boxen zat. Deze individuen

werden dezelfde dag nog in het laboratorium door een microscoop heen bewegend gefilmd en in detail gefotografeerd. Daarna werden ze geconserveerd in 96% ethanol voor DNA-analyses. De glasalen zijn na de inspectie direct uitgezet in het oppervlaktewater nabij het Gooimeer in Huizen. Bij het uitzetten werd het water samen met de glasalen door een klein zooplankton-net gefilterd, waarbij de glasalen voorzichtig in het water werden vrijgelaten. Alle organismen die met het net gevangen werden, werden in buizen met ethanol (dode organismen) of gefilterd buitenwater (levende organismen) verzameld. De totale inspectie duurde enkele uren. Hierbij werd ook een monster van het water genomen (50 ml) dat bij de glasalen in de boxen zat. Dit "transport water" is dezelfde dag in het laboratorium gebruikt om de parameters saliniteit en zuurtegraad te meten. Dit werd gedaan met een multimeter HI9829 van Hanna Instruments.

2.2 Identificaties en aanvullende moleculaire analyses

Bij de inspectie werden als meeliftende organismen alleen vlokreeften aangetroffen. De levende individuen, verzameld in een buis met water, werden eerst in het lab met behulp van een microscoop gefilmd. Elk individu kreeg hierbij een eigen GiMaRIS voucher nummer. Vervolgens werden alle verzamelde vlokreeften, levend en dood in detail gefotografeerd en gedetermineerd gebaseerd op hun morfologie. Ter bevestiging van de determinaties, werd vervolgens het DNA onderzocht van twee vlokreeften die dood waren verzameld (GiMaRIS vouchers: AG7976, AG7978) en drie individuen die levend bij de glasalen werden aangetroffen (GiMaRIS vouchers: AG7973, AG7974, AG7975; Fig 1). De DNA markers die gebruikt zijn om sequenties te verkrijgen zijn COI en 16S. Deze sequenties zijn vergeleken met sequenties die via Genbank en/of BOLD openbaar beschikbaar zijn.

2.2.1 Moleculaire protocollen

DNA-extractie is uitgevoerd met een CTAB-methode zoals deze beschreven staat voor kwallen en platwormen in Gittenberger *et al.* (2023).

Voor het vermenigvuldigen van de marker COI werd de Qiagen Rotor-Gene Q gebruikt met een standaard Qiagen PCR mix en het volgende PCR programma:

- H: 95°C / 5 min
- CT (2x): 95°C/240" ; 47°C/120" ; 72°C/120"
- CT (50x): 95°C/45" ; 46°C/45" ; 72°C/90"
- H: 72°C/ 5 min.

Hierbij is gebruik gemaakt van de specifieke primers CrustDF1 en CrustDR1 ontwikkeld door Mishra *et al.* (2019).

Voor het vermenigvuldigen van de marker 16S werd gebruik gemaakt van het PCR programma:

- H: 95°/5 min
- CT (60x): 95°/60" ; 50°/60" ; 72°/60"
- H: 72°/5 min.

Hierbij is gebruik gemaakt van de primers 16S SF en 16S SR volgens Riehl *et al.* (2014).

Aangezien de bij het onderzoek aangetroffen vlokreeft-soort bekend staat als tussen-gastheer van de Amerikaanse palingparasiet *Paratenuisentis ambiguus*, zijn aanvullende analyses uitgevoerd gericht op de detectie van deze parasiet bij vlokreeften. Hiervoor zijn primers gebruikt voor de markers 18S en COI waarmee Herlyn *et al.* (2003) en Falla *et al.* (2005) al eerder succesvol het DNA van *P. ambiguus* en/of nauw verwante soorten geanalyseerd hebben. Aanvullend zijn binnen GiMaRIS nog een derde set zeer soort-specifieke primers voor de marker COI ontwikkeld, gebaseerd op reeds bekende DNA-sequenties van *P. ambiguus*. Deze drie sets van primers zijn vervolgens gebruikt om te onderzoeken of het genetisch materiaal van de parasiet gedetecteerd kon worden binnen 5 vlokreeften die bij het glasaaltransport werden aangetroffen, en 13 vlokreeften van dezelfde soort die in 2023 tijdens een separaat onderzoek in de Waddenzee en in het Noordzeekanaal waren verzameld. Hierbij werd het PCR protocol gevolgd zoals hierboven beschreven voor de marker COI en de CrustDF1/R1 primers.

De PCR producten werden gesequenced door Macrogen Europe (macrogen-europe.com). De resulterende DNA-sequenties werden vergeleken met beschikbare sequenties op Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) en/of BOLD (boldsystems.org).

3. Resultaten

3.1. Meeliftende soorten

In totaal werden tien vlokreeften verzameld (waarvan er 4 levend waren) in het water uit twee piepschuim boxen bij ongeveer 5 kg aan glasalen. Alle gevonden individuen betroffen de tijgervlokreeft *Gammarus tigrinus* (Fig. 1), een Noord Oost Amerikaanse exoot die al vele tientallen jaren wijdverspreid in vooral zoet water in Nederland voorkomt. Deze identificaties zijn gebaseerd op de morfologie en bevestigd door DNA-sequenties (de genetische markers COI en 16S). Er werd geen ander organisch materiaal bij de glasalen gevonden dat mogelijk tot een andere soort zou kunnen behoren.

Dit garandeert niet dat er geen andere organismen aanwezig waren. De bemonstering betrof

immers een steekproef van een klein gedeelte van de getransporteerde glasalen. Verder werd de bemonstering op het oog gedaan, waarbij zeer kleine of om andere redenen zeer moeilijk zichtbare organismen mogelijk gemist zijn. Zo zouden bijvoorbeeld doorzichtige kwalletjes gemist kunnen worden omdat deze lastiger te zien zijn dan bijvoorbeeld vlokreeften.

3.2 Transport proces

De glasaal, uitgezet in het voorjaar van 2023, was 1-2 weken eerder gevangen in Frankrijk in de “Eel Management Units” BRE (= Bretagne, monding Vilaine) en LCV (Loire monding en een gebied ten zuiden van Canal de Haute Perche, met de riviertjes Lay en Sèvre Niortaise). Nadat de glasalen waren gevangen in verschillende gebieden (ieder met hun eigen vangstquota), werden deze minstens gedurende 8 dagen in bassins met zoetwater gehouden voordat ze



Fig. 1. Een van de aangetroffen levende vlokreeften - AG7973 - die geïdentificeerd is als *Gammarus tigrinus*

in gekoelde piepschuim boxen overnacht per vrachtwagen naar Nederland werden vervoerd. Bij aankomst op 10 maart rond 7:00 in de ochtend, werden de boxen bij Huizen verdeeld over verschillende auto's en vervolgens uitgezet in de Zuidelijke Randmeren, Veluwe Randmeren en het Kadoelermeer / Vollenhovermeer. Direct na aankomst in Huizen vond de inventarisatie plaats van meeliftende soorten.

3.3 Waterparameters

Het transportwater waarin de glasalen werden vervoerd in de piepschuim boxen had een saliniteit van 3,6 ppt en een zuurtegraad van pH 6,6. Zo was het water waarin de glasalen werden vervoerd dus niet volledig zoet, maar licht brak. De zuurtegraad van het water was neutraal.

4. Mogelijke maatregelen

Samenvattend laat deze studie zien dat exoten in principe mee kunnen liften met glasaaltransporten, zoals dit ook bekend is bij andere vistransporten. Dit hoeft niet automatisch te betekenen dat deze transporten een risico voor de natuur in Nederland vormen. Dat is onder andere afhankelijk van de soort die meelift en het waterlichaam waar deze wordt uitgezet. Zo komt de binnen de huidige studie aangetroffen vlokreeft *Gammarus tigrinus* al wijd verspreid in de Nederlandse zoete tot licht brakke wateren voor, waarbij de invoer van extra individuen mogelijk geen verhoogd risico veroorzaakt. Maatregelen die het risico op meeliftende exoten in het algemeen zouden kunnen minimaliseren, kunnen zich vermoedelijk het best richten op het bassin in Frankrijk waarin de glasalen in leven worden gehouden nadat ze zijn gevangen. Daarin verblijven ze voor tenminste 8 dagen voorafgaand aan het transport naar Nederland. Hierbij speelt de vraag of de individuen van een exoot zoals *G. tigrinus* al bij de glasalen

zaten toen deze gevangen werden, of dat de desbetreffende vlokreeften secundair zijn "toegevoegd" via water waarmee deze bassins gevuld zijn. Dit kan niet worden geconcludeerd op basis van het huidige onderzoek. Indien zou blijken dat de bassins gevuld werden met buitenwater waarin deze vlokreeften aanwezig waren, is het misschien mogelijk om dit water voorafgaand te filtreren. Daarmee kan dit risico geminimaliseerd worden. Indien de vlokreeften al bij de glasalen zaten toen deze werden opgevisst, kan mogelijk via een inspectie van het water in het bassin, voorafgaand aan het transport, worden vastgesteld welke soorten zich bij de glasalen bevinden. Vervolgens kan gebaseerd op soortspecifieke risico-analyses beoordeeld worden of de potentieel meeliftende soorten naar verwachting een additief risico zullen vormen voor de Nederlandse natuur.

5. Discussie en conclusies

Het feit dat levende individuen van de Noord-Amerikaanse exoot *Gammarus tigrinus* bij de glasalen zijn vastgesteld, geeft aan dat exoten in principe kunnen meeliften met glasaaltransporten. Aangezien deze specifieke vlokreeft al wijd verspreid is in Nederland in vooral de zoete en licht brakke wateren, vormt de invoer van individuen van deze soort in deze wateren vermoedelijk geen additief risico. Hierbij heeft *G. tigrinus* een sterke voorkeur voor zoete tot licht brakke wateren. Deze soort vormt naar verwachting weinig risico voor wateren met een hoger zout gehalte, zoals de Grevelingen en het Veerse Meer, aangezien de vlokreeften dit vermoedelijk niet zullen overleven. Aangezien transporten van glasalen plaats vinden nadat deze tenminste 8 dagen in een bassin in Frankrijk zijn gehouden, zou het mogelijk kunnen zijn om deze bassins voorafgaand aan het transport al te inspecteren op potentieel meeliftende soorten.

6. Amerikaanse palingparasiet

De huidige studie had zich in eerste instantie niet gericht op uitheemse endo-parasieten en pathogenen die mogelijk met de glasaal-transporten mee geïntroduceerd zouden kunnen worden. Met een dergelijk risico dient mogelijk in de huidige situatie wel rekening gehouden te worden. Zo staat de Noord-Amerikaanse tijgervlokreeft bekend als de enige vlokreeftsoort die als tussengastheer kan fungeren van de Noord-Amerikaanse palingparasiet *Paratenuisentis ambiguus*. Toen in 1957 tijgervlokreeftjes in de Duitse Wezer rivier vanuit Amerika werden geïntroduceerd, is deze parasiet meegekomen. Hierna kregen vooral palingen in de Duitse rivieren en meren last van deze parasiet. Sindsdien is hij in de Rijn, de kustwateren van Polen en in de noordelijke Vistula Lagoon in Rusland vastgesteld (Sures *et al.*, 1999; Rodjuk & Shelenkova, 2006; Dzido *et al.*, 2020). In hun studie naar palingparasieten in Nederland noemen Borgsteede *et al.* (1999) *P. ambiguus* wel, maar alleen als voorkomend in Duitsland. In hoeverre deze soort zich momenteel al in de Nederlandse of Franse wateren heeft gevestigd, is onduidelijk. Daarom kan niet goed worden ingeschat of er een risico bestaat dat deze uitheemse palingparasiet wordt ingevoerd via tijgervlokreeften, meeliftend met glasalen afkomstig uit Frankrijk.

Om meer duidelijkheid te krijgen is daarom een aanvullende moleculair onderzoek gedaan waarbij 3 verschillende DNA-analyses zijn uitgevoerd bij 18 individuen van de Noord-Amerikaanse tijgervlokreeft *Gammarus tigrinus*. Deze analyses richtte zich specifiek op de detectie van het DNA van de parasiet, mocht deze aanwezig zijn. Vijf van de hierop geteste vlokreeften waren verzameld bij de geïmporteerde glasalen. De overige betroffen

G. tigrinus individuen uit de Waddenzee en het Noordzeekanaal waar deze exoot reeds algemeen voorkomt. Het genetische materiaal van de palingparasiet is bij dit aanvullende onderzoek niet aangetroffen, wat betekent dat er geen bewijs is gevonden dat deze parasiet meelift met glasaaltransporten. De mogelijkheid dat deze parasiet met *G. tigrinus* kan meeliften, kan gebaseerd hierop echter niet worden uitgesloten.

7. Literatuur

- Borgsteede, F.H.M., Haenen, O.L.M., De Bree, J. & O.I. Lisitsina, 1999.** Parasitic infections of European eel (*Anguilla anguilla* L.) in the Netherlands. *Helminthologia* 36(4): 251-260.
- Dzido, J, Rolbiecki, L, Izdebska, J.N. & R. Bednarek, 2020.** Checklist of the parasites of European eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758) (Anguillidae) in Poland. *Biodiversity Data Journal* 8, e52346.10.3897/BDJ.8.e52346
- Falla, A.C., Brieva, C. & P. Bloor, 2005.** Mitochondrial DNA diversity in the acanthocephalan *Prosthenorchis elegans* in Colombia based on cytochrome c oxidase I (COI) gene sequence). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3): 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.08.002>.
- Gittenberger, A., Rensing M. & K.H.Wesdorp, 2018.** Exoten in de visketen: gevareninventarisatie en risicoschatting. I.o.v. Bureau Risicobeoordeling & onderzoek, Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. GiMaRIS rapport 2018_24: 77 pp.
- Gittenberger, A., Rensing, M., Faasse, M.A., van Walraven, L., Smolders, A.A.J., Keeler Perez, H. & E. Gittenberger, 2023.** Non-Indigenous Species Dynamics in Time and Space within the Coastal Waters of The Netherlands. *Diversity* 15: 719. <https://doi.org/10.3390/d15060719>.
- Herlyn, H., Piskurek, O., Schmitz, J., Ehlers, U. & H. Zischler, 2003.** The syndermatan phylogeny and the evolution of acanthocephalan endoparasitism as inferred from 18S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 155–164.
- Mishra, A., Roy, U., Kushwaha, S.K., Lulla, S. & R. Prajapati, 2019.** Modified CTAB method for high-quality genomic DNA extraction from ship barnacle (*Balanus* sp.). *Indian Journal of Animal Sciences* 89(6): 699–01
- Riehl, T., Brenke, N., Brix, S., Driskell, A., Kaiser, S. & A. Brandt, 2014.** Field and laboratory methods for DNA studies on deep-sea isopod crustaceans. *Polish polar research* 35(2): 203-224.
- Rodjuk, G. & O. Shelenkova, 2006.** Parasite fauna of the European eel (*Anguilla anguilla* L. 1758) from the Russian part of the Vistula Lagoon (Baltic Sea). *Wiadomości parazytologiczne* 52, 121–125.
- Sures, B., Knopf, K., Würtz, J. & J. Hirt, 1999.** Richness and diversity of parasite communities in European eels *Anguilla anguilla* of the river Rhine, Germany, with special reference to helminth parasites. *Parasitology* 119, 323–330.10.1017/S0031182099004655