

Effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring rijkswateren

Eindrapport



M. Schutter
N. van Kessel
K. van Bochove
M. Hootsmans
E. Kardinaal



Bureau Waardenburg
Ecologie & Landschap



Datura
CONSULTANTS IN BIOLOGY

KWR
Watercycle Research Institute

Effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring rijkswateren

Eindrapport

M. Schutter
N. van Kessel
K. van Bochove
M. Hootsmans
E. Kardinaal



Effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring rijkswateren

Eindrapport

Dr. ir. M. Schutter, N. van Kessel MSc., K. Van Bochove MSc., dr. ir. M. Hootsmans & dr. E. Kardinaal

Status uitgave: definitief
Rapportnummer: 19-147
Projectnummer: 17-0864
Datum uitgave: 30 januari 2020
Foto's omslag: Bureau Waardenburg
Projectleider: N. van Kessel MSc.
Tweede lezer: dr. E. Kardinaal
Naam en adres opdrachtgever: Rijkswaterstaat Centrale Informatievoorziening
Derde Werelddreef 1, Postbus 556 Delft
Referentie opdrachtgever: Zaaknummer: 31134905
Akkoord voor uitgave: D. Emond

Paraaf:

Graag citeren als: 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.

Trefwoorden: eDNA metabarcoding, vissen, rijkswateren, vismonitoring, passieve vismonitoring

Bureau Waardenburg bv is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Bureau Waardenburg bv.

Oprachtgever hierboven aangegeven vrijwaart Bureau Waardenburg bv voor aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

© Bureau Waardenburg bv / Rijkswaterstaat Centrale Informatievoorziening

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van opdrachtgever en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag worden vervaardigd en/of openbaar gemaakt worden d.m.v. druk, fotokopie, digitale kopie of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever hierboven aangegeven en Bureau Waardenburg bv, noch mag het zonder een dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd.

Lid van de branchevereniging Netwerk Groene Bureaus. Het kwaliteitsmanagementsysteem van Bureau Waardenburg bv is door CERTIKED gecertificeerd overeenkomstig ISO 9001: 2015. Bureau Waardenburg bv hanteert als algemene voorwaarden de DNR 2011, tenzij schriftelijk anders wordt overeengekomen.



Bureau Waardenburg, Postbus 365 4100 AJ Culemborg, 0345 51 27 10, info@buwa.nl, www.buwa.nl





Voorwoord

Rijkswaterstaat (RWS) is als waterbeheerder verantwoordelijk voor een goede ecologische toestand van de Rijkswateren, waaronder voor vis. RWS had de wens om de mogelijkheden te laten onderzoeken voor het implementeren van eDNA metabarcoding om de visstand in Rijkswateren te monitoren, om mogelijk op termijn de traditionele vismonitoring (gedeeltelijk) te vervangen.

Deze rapportage beschrijft een grootschalige pilot-studie, waarbij eDNA metabarcoding is toegepast in drie Rijkswateren en geëvalueerd ten opzichte van bestaande vismonitoringstechnieken.

De volgende personen worden bedankt voor hun bijdrage in voorliggend onderzoek:

eDNA veldbemonsteringen: Udo Van Dongen, Martijn Dorenbosch, Steven Stemerding, Michiel van de Vooren.

Laboratoriumanalyses en bio-informatica: Jitske Rook (Datura Molecular Solutions) en Goffe Elsinga, Bart Wullings (KWR Watercycle Research Institute).

Data-analyse: Martijn Dorenbosch.

GIS-werkzaamheden: Paul de Gier.

Interne kwaliteitswaarborging: D. Emond.

Externe kwaliteitswaarborging: Berry van der Hoorn (Naturalis).

Begeleidingsgroep Rijkswaterstaat: Stan Banach, Arnold Veen, Eddy Lammens, Marjoke Muller, Gerrit Vossebelt en Mervyn Roos.



Inhoud

Voorwoord	4
Samenvatting	7
1 Inleiding	12
1.1 Probleem- en doelstelling	12
1.2 Vraagstellingen	13
2 Meetplan	14
2.1 Onderzoekslocaties	14
2.2 Plan van aanpak veldwerkzaamheden	16
2.2.1 Meetcampagne seizoen	16
2.2.2 Meetcampagne detail	16
2.2.3 Controlemeting	19
2.2.4 Omgevingsvariabelen	19
2.3 Uitvoering bemonsteringen	19
2.3.1 Monstername	19
2.3.2 Mengmonsters en individuele monsters	20
2.3.3 Filtratie in het veld	20
2.3.4 Negatieve veldcontrole	20
2.4 Laboratorium werkzaamheden & bio-informatica	22
2.4.1 DNA extractie	23
2.4.2 PCR analyse	23
2.4.3 Next Generation Sequencing & bio-informatica	24
2.4.4 Duplo analyse	25
2.4.5 ddPCR	25
2.4.6 Controle efficiëntie PCR en NGS en negatieve veldcontrole	25
2.4.7 Data-analyse	27
3 Resultaten veldonderzoek eDNA	28
3.1 Soortengemeenschap in actieve en passieve vismonitoring	28
3.2 Soortgemeenschap op basis van eDNA metabarcoding	32
3.3 Vergelijking eDNA en traditionele monitoring	36
3.3 Variatie soorten op basis van eDNA metabarcoding	40
3.3.1 Variatie soortenrijkdom per habitat	40
3.3.2 Variatie soortenrijkdom per locatie	43
3.3.3 Soortenrijkdom in de tijd	45
3.3.4 Voorkomen van doelsoorten in de tijd	46
3.3.5 Zoutgehalte en turbiditeit in relatie tot eDNA	47



4	Methodiek eDNA en betrouwbaarheid	50
4.1	Verstorende factoren van eDNA resultaten	50
4.2	Validatie van de methodiek	55
4.3	Verschillen tussen laboratoria	59
4.4	Bemonsteringsinspanning	63
4.5	Effect van eDNA concentratie	67
4.6	Bruikbaarheid eDNA monster	68
5	Discussie & conclusies	70
5.1	Geschiktheid van eDNA metabarcoding	70
5.2	Betrouwbaarheid eDNA i.r.t. misinterpretatie positieve waarnemingen	72
5.3	Kostenefficiënte uitvoering eDNA metabarcoding	72
6	Kennisleemten en aanbevelingen	73
6.1	Veldbemonstering	73
6.2	Lab analyse	75
6.3	Markerkeuze	77
6.4	Referentiedatabase	78
6.5	Bio informatica	78
7	Literatuur	79
Bijlage I	Uiteenzetting laboratorium werkzaamheden	81
Bijlage II	Referentie databases	84
Bijlage III	Vergelijk laboratoria	89
Bijlage IV	Duplo monsters	91
Bijlage V	Discrepantie soorten eDNA traditionele vangmethodieken	93
Bijlage VI	Effect van bio-informatica filters	96
Bijlage VII	Concept RWS-V	98



Samenvatting

Inleiding

In voorliggende studie is onderzocht of environmental DNA (eDNA) metabarcoding een effectieve methode is voor het monitoren van vissen in rijkswateren. Onderzocht is hoe ruimtelijke variatie in monsternamen en bemonsteringsinspanning van invloed is op eDNA detectie van (rivier)vissen en hoe eDNA resultaten zich verhouden ten opzichte van traditionele vismonitoringstechnieken (actieve en passieve vismonitoring). Omdat voor eDNA onderzoek ten aanzien van vissen in rijkswateren nog geen standaard methodiek beschikbaar is, is in dit onderzoek ook aandacht besteed aan methodische aspecten die van invloed kunnen zijn op de effectiviteit en betrouwbaarheid van eDNA als instrument om de visgemeenschap in rijkswateren in beeld te brengen.

Methode veld

Tijdens dit onderzoek zijn binnen de waterlichamen Haringvliet, Nieuwe Waterweg en Rijn gedurende drie meetrondes in het voorjaar en drie meetrondes in het najaar ("**seizoen bemonstering**") op drie locaties eDNA monsters genomen, waarbij per locatie drie habitats (oever, oppervlakte en bodem) zijn bemonsterd. Bemonstering per habitat vond plaats op basis van mengmonsters, waarbij per locatie per habitat 10 deelmonsters van 100 mL zijn samengevoegd tot één monster van 1L.

Om inzicht te krijgen in ruimtelijke variatie van de visgemeenschap is tijdens één meetronde in het voorjaar en één meetronde in het najaar een detailbemonstering uitgevoerd ("**meetcampagne detail**"). Deze bemonstering is uitgevoerd in dezelfde waterlichamen, locaties en habitats als de "seizoenbemonstering", maar vond plaats op basis van individuele eDNA monsters, waarbij per locatie per habitat in plaats van een mengmonster 10 monsters zijn genomen van 1L per monster.

Methode laboratorium

De monsters zijn overgebracht naar het laboratorium. In het laboratorium zijn ze vervolgens opgewerkt, waarbij eDNA isolatie, vermeerdering via PCR en Next Generation Sequencing heeft plaatsgevonden. Tenslotte heeft er een bio-informatica stap plaatsgevonden, waarbij de gegenereerde DNA-sequenties uit het veldmonster aan vissoorten zijn gerelateerd met behulp van een referentiedatabase en waarbij PCR- en sequencefouten en mogelijke vals positieve detecties zijn verwijderd. Voor de soortdetectie is gebruik gemaakt van twee DNA targetregioenen waarop specifieke primers ontworpen zijn; de 12S en 16S regioenen.

Onderzoeksresultaten

16S vs. 12S

Met gebruik van 16S zijn structureel meer soorten gedetecteerd dan met 12S. Daarnaast zijn met 16S alle doelsoorten gedetecteerd. Hoewel 12S over het algemeen in minder informatie voorziet, levert het ten opzichte van 16S wel aanvullende informatie over soorten op. Om de aan- of afwezigheid van eDNA van vissoorten in de waterkolom vast te stellen, heeft het combineren van de primers 16S en 12S meerwaarde.



eDNA vs. traditionele monitoring

eDNA monitoringsresultaten uit 2018 konden niet vergeleken worden met data van traditionele vismonitoring omdat deze voor het jaar 2018 als gevolg van o.a. droogte niet beschikbaar was. eDNA resultaten zijn daarom vergeleken met data van traditionele vismonitoring uit de periode 2012 – 2016. Als gevolg van het vergelijken van de resultaten van een éénjarige eDNA monitoring met een meerjarige traditionele monitoring is het verschil in gedetecteerde soorten met behulp van eDNA en gevangen soorten met behulp van traditionele methodieken in de drie waterlichamen vergelijkbaar. Echter, iedere methodiek levert naast overeenkomstige soorten ook unieke soorten op.

Soortenrijkdom per locatie

Per waterlichaam zijn drie locaties bemonsterd. Locatie heeft geen effect op de gemiddelde soortenrijkdom. Op iedere locatie worden zowel overeenkomstige als unieke soorten gedetecteerd. Het totaal aantal soorten wordt echter hoger naarmate er meer locaties worden bemonsterd.

Soortenrijkdom per habitat

Per locatie zijn drie habitats bemonsterd: oppervlakte, bodem en oever. Het gemiddeld aantal soorten tussen habitats verschilt nauwelijks, met uitzondering van een bodemmonster uit de Nieuwe Waterweg waar beduidend minder soorten aangetroffen werden dan in overige monsters. Wel worden ook in ieder afzonderlijk habitat zowel overeenkomstige als unieke soorten gedetecteerd. Het totaal aantal soorten wordt echter hoger naarmate er meer habitats worden bemonsterd.

Soortenrijkdom in tijd

De gemiddelde soortenrijkdom is in het Haringvliet en de Rijn gedurende de maanden waarin de eDNA monitoring heeft plaatsgevonden relatief constant. Alleen in de Nieuwe Waterweg is variatie waargenomen, mogelijk als gevolg van migrerende vissoorten. Ten aanzien van doelsoorten is hetzelfde patroon aangetroffen.

Effectiviteit en betrouwbaarheid eDNA

Misinterpretaties

In het onderzoek zijn zeven factoren naar voren gekomen die kunnen leiden tot misinterpretaties van eDNA resultaten. Op basis van resultaten uit het onderzoek, worden de volgende vier factoren aangewezen als factoren waarvan de kans matig tot groot wordt geacht dat zij voor misinterpretaties zorgen:

- Lozingen door o.a. RWZI's, schepen en recreatie zorgen voor aanvoer van gebiedsvreemd eDNA van consumptievis/aasvis;
- Scheepvaart zorgt voor gebiedsvreemd eDNA van alle vissoorten uit stroomopwaartse of -afwaartse gebieden.
- Waterstroming zorgt voor aanvoer van gebiedsvreemd DNA uit bovenstroomse wateren;
- Veldwerkers en -materialen brengen gebiedsvreemd eDNA in het monster.



Validatie methodiek

De methodiek is gevalideerd door tijdens de analyses enkele monsters uit een mock-community mee te nemen. De mock-community in voorliggend onderzoek betreft een artificieel samengesteld DNA-monster met daarin bekende hoeveelheden DNA van 28 zoet- en zoutwatervissoorten. Deze controle geeft inzicht in de efficiëntie van de PCR stappen en de juiste werking van de NGS-methode voor tenminste de vissoorten in de Mock-community en is een maat voor het al dan niet voorkomen van vals negatieve detecties. Analyse leidde tot een consequente detectie van de soorten in de mock-community, waarmee de betrouwbaarheid van de toegepaste eDNA methodiek om soorten te detecteren is gevalideerd.

Verschillen tussen laboratoria

Om effecten van methodische verschillen tussen laboratoria op gegenereerde vissoortenlijsten inzichtelijk te maken zijn duplo analyses uitgevoerd, waarbij van elk betreffend monster één duplo door het laboratorium van Datura, de ander duplo door het laboratorium van KWR. De mate van overeenkomst tussen de gegenereerde soortenlijsten van beide laboratoria (ideaaliter 100%) geeft inzicht in hoeverre het laboratorium/procedure van invloed is op de eDNA detectie.

De gedetecteerde soortenlijst was voor 62% overlappend. Het gebruik van verschillende sets primers, verschillen in referentie databases, verschillen in werkwijze in het laboratorium en verschillend in instellingen van de bio-informatica leidt tot een relatief groot verschil tussen laboratoria.

Bemonsteringsinspanning

Om inzicht te geven in het exacte aantal monsters dat nodig is om een zo compleet mogelijk beeld te geven van de vislevensgemeenschap zijn soortverzadigingscurves opgesteld voor doelsoorten in de drie waterlichamen. Voor de drie onderzochte waterlichamen kan worden gesteld dat circa 15 – 20 monsters nodig zijn om een compleet beeld van de vislevensgemeenschap te krijgen.

Mengmonster vs. individueel monster

De effectiviteit van een mengmonster is vergeleken met de effectiviteit van een individueel monster. Soortverzadigingscurves laten zien dat tien individuele monsters van 1 L een hogere soortenrijkdom leveren dan een mengmonster van 10 x 100 mL. Dit geldt voor de habitats oppervlakte en bodem voor alle drie de waterlichamen.

Effect eDNA concentratie

Met Digital Droplet PCR (ddPCR) is bepaald of de concentratie eDNA in een monster gerelateerd is aan de trefkans van vissoorten. Resultaten indiceren dat bij lagere concentraties DNA rekening gehouden moet worden met een lagere trefkans. Er is onvoldoende data verzameld om een betrouwbare uitspraak te doen hoeveel DNA-kopieën er minimaal nodig zijn voor een redelijke trefkans.



Bruikbaarheid eDNA monster

Voor de bruikbaarheid van een monster wordt het aantal 'reads' gehanteerd. DNA sequencing van een monster moet resulteren in tenminste 300.000 reads. Uit het onderzoek kwam naar voren dat circa 18% van de monsters niet het gewenste resultaat gaven. Bij het opzetten van een bemonsteringsstrategie moet met deze foutmarge rekening gehouden worden.

Samengevatte conclusies

- De combinatie van de primers 16S en 12S, het bemonsteren van meerdere locaties en habitats leveren de meeste soorten op.
- Er kan variatie in soortsaanwezigheid in de tijd optreden, mogelijk omdat vissoorten simpelweg niet altijd aanwezig zijn als gevolg van migratie. eDNA monsters dienen dan ook op meerdere tijdstippen in het jaar, bij voorkeur voor- en najaar, genomen te worden.
- Misinterpretaties kunnen optreden, met name als gevolg van antropogene oorzaken in het veld.
- Analyse van een mock-community heeft aangetoond dat de eDNA methodiek een betrouwbare methode is om soorten aan te tonen.
- Omdat er geen gedetailleerde strategie voor eDNA metabarcoding van rijkswateren is vastgesteld, resulteren methodische verschillen tussen laboratoria in afwijkende soortenlijsten. De soortenlijsten zijn echter voor het grootste deel overlappend.
- Het minimum aantal monsters voor een compleet soortbeeld ligt tussen de 15 en 20, afhankelijk van het waterlichaam.
- Individuele monsters leveren een hogere soortenrijkdom dan mengmonsters.
- Een lagere absolute DNA concentratie lijkt te resulteren in een lagere trefkans van vissoorten.
- Bij het opzetten van een bemonsteringsstrategie dient rekening gehouden te worden met foutmarge ten aanzien van het aantal bruikbare monsters.
- Met behulp van eDNA kan een representatief beeld van de vislevensgemeenschap worden verkregen. Het is voornamelijk lastig vast te stellen of het eDNA daadwerkelijk afkomstig is van vissen in de nabije omgeving van de locatie waar het monster is genomen.
- eDNA metabarcoding is gevoelig voor misinterpretatie. Dit kan deels worden ondervangen door het nemen van negatieve veldcontroles en 'schoon' werken. Een groot deel van de misinterpretatie wordt echter veroorzaakt door antropogene verstoringen die in rijkswateren aanwezig zijn. Aanvullend onderzoek is noodzakelijk om zicht te krijgen op de invloed van deze antropogene verstoringen.

Geschiktheid van eDNA metabarcoding

eDNA metabarcoding is geschikt om een kwalitatief beeld te krijgen van de vissoorten in rijkswateren. Omdat eDNA niet per se afkomstig is van de bemonsteringslocatie dient de geografische schaal waarvoor dit kwalitatieve beeld geldt nader te worden gedefinieerd. eDNA metabarcoding en traditionele vismonitoring (passieve en actieve monitoring) leveren zowel overeenkomstige als unieke soorten op. De methoden zijn complementair.



Betrouwbaarheid eDNA i.r.t. misinterpretatie

De kans op misinterpretatie lijkt voornamelijk het gevolg van oorzaken in het veld en te spelen tijdens het nemen van monsters. Met name de effecten van de moeilijk te controleren oorzaken in het veld, zoals lozingen, dienen nader onderzocht te worden.

Kostenefficiënte uitvoering eDNA metabarcoding

Onafhankelijk van het type data dat wordt gegenereerd met eDNA metabarcoding in vergelijking met traditionele monitoring en de te hanteren monitoringsstrategie, lijken de kosten niet veel te verschillen. Traditionele monitoring resulteert in hoge kosten voor veldbemonsteringen, terwijl eDNA metabarcoding resulteert in hoge kosten voor labanalyses. Op basis van een meer uitgekristalliseerde monitoringsstrategie voor eDNA metabarcoding in rijkswateren kan hierop een eenduidiger antwoord gegeven worden.



1 Inleiding

Rijkswaterstaat (RWS) is als waterbeheerder verantwoordelijk voor een goede ecologische toestand van de Rijkswateren en spant zich via diverse projecten in voor verbetering van de ecologische kwaliteit. Daarnaast monitort RWS voortdurend deze kwaliteit, voor vis bijvoorbeeld middels de actieve en in het recente verleden via de passieve Vismonitoring Zoete Rijkswateren. De voortgang van de passieve Vismonitoring wordt momenteel belemmerd door ontwikkelingen in het wettelijk kader (Europese Aalrichtlijn, 2009; Beleidsregel gesloten gebieden voor visserij op aal, 2011). Tegelijkertijd lijkt Environmental DNA (eDNA) metabarcoding een innovatieve en veelbelovende methode (Herder *et al.* 2014) om mogelijk op termijn bestaande monitoring zoals de passieve vismonitoring te vervangen.

Tot op heden is de effectiviteit van eDNA metabarcoding echter nog niet bewezen op het niveau dat door RWS als standaard wordt gebruikt. Inmiddels zijn verschillende pilotstudies uitgevoerd die de bruikbaarheid van eDNA metabarcoding in stromende wateren onderschrijven (Kardinaal *et al.* 2014; van Bochove 2015a, 2015b; Dorenbosch & Broeckx 2016; Patberg *et al.* 2016; Dorenbosch 2017; Hootsmans *et al.* 2017; van der Kamp *et al.* 2018). In de Rijkswateren is nog geen vergelijking voorhanden die eDNA metabarcoding resultaten vergelijkt met traditionele vismonitoringstechnieken zoals de passieve monitoring. Om te bepalen of en hoe eDNA metabarcoding ingepast kan worden als methodiek om de visstand in Rijkswateren (deels) te monitoren, hebben Bureau Waardenburg, Datura Molecular Solutions en KWR in opdracht van RWS in 2018 en 2019 een grootschalige pilotstudie uitgevoerd. De techniek wordt toegepast in het veld en wordt geëvalueerd ten opzichte van bestaande vismonitoringstechnieken.

1.1 Probleem- en doelstelling

eDNA metabarcoding lijkt een veelbelovende techniek om de soortensamenstelling van een visgemeenschap in kaart te brengen (Rees *et al.* 2014), ook in stromende wateren (van Bochove 2015a, 2015b; Patberg *et al.* 2016; Valentini *et al.* 2016; Hootsmans *et al.* 2017; Griffioen & van Bochove 2018, van der Kamp *et al.* 2018). De techniek is zodanig gevoelig dat extreem kleine hoeveelheden eDNA opgepikt kunnen worden waardoor de detectiekans van vissen met een verborgen levenswijze en/of in zeer lage dichtheden aanzienlijk groter is in vergelijking met traditionele visserij methodes (Valentini *et al.* 2016; Olds *et al.* 2016; Thomsen *et al.* 2016).

In veel studies wordt vooral aandacht besteed aan de nauwkeurigheid en de voordelen van de methodiek. Zo is worden er als gevolg van de methode vaak meer soorten aangetoond dan op basis van gangbare methodieken aangetroffen worden. Daarnaast is de methodiek objectief en zijn de veldwerkspanningen beperkt. Bovendien is de verwachting dat op termijn kosten voor DNA-technieken laag zullen worden.

Er zijn echter ook risico's bij het toepassen van de eDNA methodiek (Roussel 2015). Hierbij valt te denken aan de volgende zaken:

- Verspreiding en overleving van het eDNA in het milieu;



- Variatie in de toepassing van bemonsterings- en laboratoriumtechnieken en daarmee de interpretatie en de vergelijkbaarheid van de uitkomsten;
- De gevoeligheid van de methode is tegelijk ook een risico: er bestaat een kans op contaminatie tijdens het veld- en laboratoriumwerk en daarmee de kans op vals positieve waarnemingen;
- De keuzes en instellingen bij de bio-informatica introduceert mogelijk foute resultaten, zodoende kunnen aanwezige soorten niet gedetecteerd worden, een kans op vals negatieve resultaten.

Deze aspecten zullen in onderliggend rapport aan de orde komen.

1.2 Vraagstellingen

In deze studie wordt onderzocht hoe bemonsteringsinspanning en ruimtelijke variatie van invloed zijn op eDNA detectie van (rivier)vissen en hoe eDNA resultaten zich verhouden ten opzichte van traditionele vismonitoringstechnieken (bijv. actieve en passieve vismonitoring).

Hierbij zijn de volgend hoofdvragen gedefinieerd:

- Is eDNA metabarcoding een geschikte methode om een representatief kwalitatief beeld van vissoorten in Rijkswateren te verkrijgen?
- Wat is de betrouwbaarheid van eDNA metabarcoding in relatie tot het optreden van misinterpretatie van positieve waarnemingen?
- Op welke wijze (bemonsteringsinspanning, monsterlocaties, laboratoriumproces, bio-informatica, etc.) kan eDNA metabarcoding kosteneffectief worden ingezet voor het monitoren van vissoorten in Rijkswateren?
- Is eDNA metabarcoding op korte termijn een mogelijke vervanger voor de passieve vismonitoring?



2 Meetplan

Het in dit onderzoek toegepaste meetplan is erop gericht om de toepasbaarheid van eDNA detectie als mogelijk monitoringsinstrument van vissen in grote stromende wateren te onderzoeken. Hierbij zijn monsters verzameld uit drie KRW-waterlichamen, verspreid over verschillende monsterlocaties. eDNA detectie wordt daarbij vergeleken met traditionele visserij. Er wordt onderscheid gemaakt tussen seizoensmetingen (omschreven als 'meetcampagne seizoen') om variatie in aanwezigheid van soorten gedurende seizoenen vast te stellen en trefkansen te berekenen, en er worden ruimtelijke detailmetingen (omschreven als 'meetcampagne detail') uitgevoerd om het effect van ruimtelijke variatie op de monsternamen vast te stellen. In onderstaande paragrafen wordt het meetplan uiteengezet.

2.1 Onderzoekslocaties

Om inzicht te geven in de toepasbaarheid van eDNA detectie voor het monitoren van vissoorten in het Nederlandse rivierengebied zijn drie KRW-waterlichamen geselecteerd. Deze waterlichamen staan model voor de variatie in grote waterlichamen in het Nederlandse rivier continuüm en vormen een representatieve weergave van watersystemen die een connectie vormen voor vissen tussen de Noordzee, de Nederlandse zoete Rijkswateren en de stroomopwaarts gelegen Duitse Rijn.

Haringvliet en Nieuwe Waterweg

Twee van de geselecteerde waterlichamen zijn estuaria waar de zee invloed heeft op het watersysteem door getijdewerking en zoet-zout gradiënten (KRW watertype O2). Dit zijn het Haringvliet (figuur 2.1) en de Nieuwe Waterweg (figuur 2.2).

Het Haringvliet is opgedeeld in twee KRW-waterlichamen: Haringvliet oost (NL94_1) en Haringvliet-west (NL94_11). De metingen vonden plaats in Haringvliet west. Het Haringvliet is tevens aangewezen als Natura 2000 gebied, met daarin o.a. de doelsoorten zeeprik, rivierprik, elft, fint, zalm en bittervoorn. De Nieuwe Waterweg is als geheel één KRW-waterlichaam (NL94_9) en staat in open verbinding met zee. Het waterlichaam kenmerkt zich door een duidelijke getijdeslag en gradiënt in zoutgehalte. Het Haringvliet was tijdens de veldbemonsteringen van dit onderzoek (2018) afgesloten van zee door de Haringvlietdam. Er is dan geen invloed van zee op de binnenkant van het Haringvliet, alleen de schutsluizen bij Stellendam zorgen voor zeer beperkte indringing van zout water naar het Haringvliet. Tijdens de uitvoering van het onderzoek zou het 'kierbesluit' in werking treden (september 2018), waardoor het effect van de herstelde verbinding met zee op de visstand in het Haringvliet binnen het huidige onderzoek kon worden meegenomen. Door de lage waterstand gedurende de onderzoeksperiode is de daadwerkelijke uitvoering van het 'kierbesluit' echter uitgesteld tot januari 2019. Hierdoor was het Haringvliet tijdens het voorliggende onderzoek formeel een O2 water, maar functioneel nog niet.

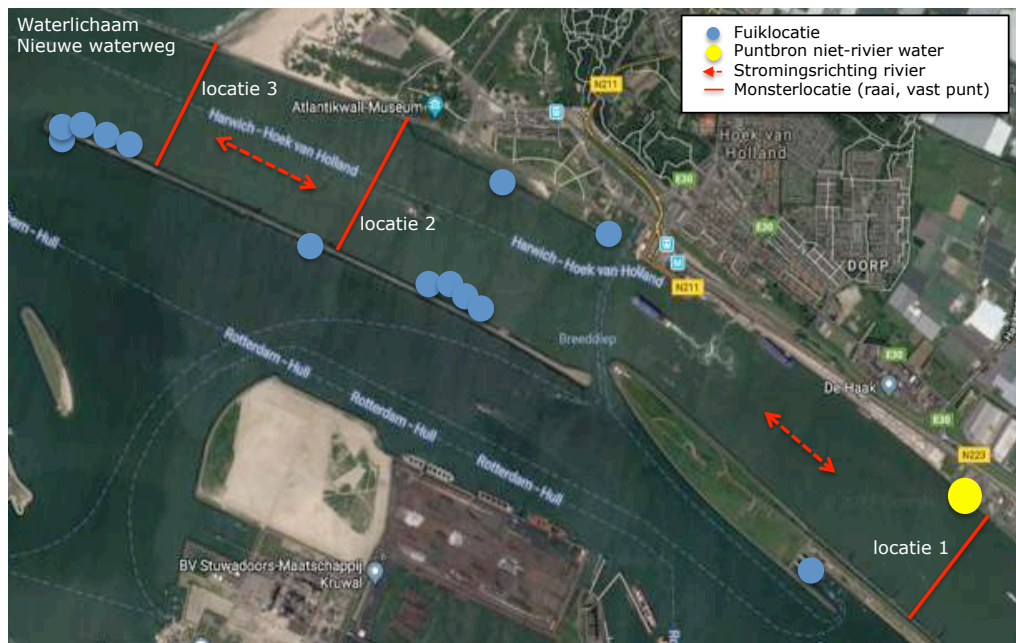


Rijn

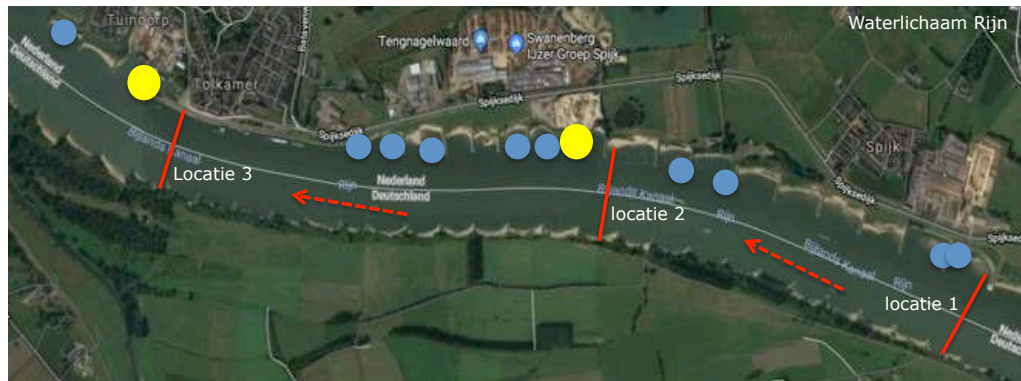
Het derde waterlichaam betreft de Rijn ter hoogte van Lobith (figuur 2.3). Dit meetpunt ligt in het KRW-waterlichaam Bovenrijn-Waal (NL93_8) dat van de Duitse Grens tot Gorinchem loopt. De Rijn is representatief voor een traag stromende rivier met hoofdstroom en nevengeulen dat grote delen van het Nederlandse rivierengebied kenmerkt (KRW watertype R7). De Rijn bij Lobith betreft de grens waar de Rijn vanuit Duitsland Nederland binnenstroomt en vormt een belangrijke route voor migrerende vissen in het Rijnsysteem.



Figuur 2.1. Overzicht van het Haringvliet en monsterlocaties.



Figuur 2.2. Overzicht van de Nieuwe Waterweg en monsterlocaties.



Figuur 2.3. Overzicht van de Rijn en bemonsteringslocaties.

2.2 Plan van aanpak veldwerkzaamheden

2.2.1 Meetcampagne seizoen

De meetcampagne in het seizoen gaat in op de trefkans van vissen in de tijd en in drie verschillende habitats in de rivier. De eDNA concentratie is waarschijnlijk het hoogst dicht aan het wateroppervlak en boven de bodem (Moyer et al. 2014). Het is onbekend hoe eDNA zich gedraagt in zoet-zout gradiënten. Daarom zijn tijdens elke meetronde per monsterlocatie eDNA monsters verzameld uit drie habitats: 1) aan het wateroppervlak (0.1 m onder het wateroppervlak), 2) op diepte nabij de bodem (1 m boven de bodem om onbedoelde bemonstering van historisch DNA vanuit het sediment te voorkomen) en 3) in de ondiepe oeverzone (0.1 m onder het wateroppervlak), zie ook figuur 2.4.

In de seizoensgebonden meetcampagne is in alle waterlichamen dezelfde methodiek gehanteerd om een vergelijking tussen monsters van verschillende waterlichamen, locaties en habitats mogelijk te maken. Er worden uitsluitend mengmonsters verzameld. Per monsterlocatie zijn voor de habitats “oppervlakte” en “bodem”, tien deelmonsters vanuit een boot in een raai dwars over de rivier verzameld (figuur 2.4). Voor het habitat ondiepe oeverzone zijn vanaf een vast punt ook tien deelmonsters verzameld, bijvoorbeeld vanaf een veilige locatie op een kade (figuur 2.4). Alle deelmonsters zijn verzameld met behulp van een peristaltische pomp (foto 2.1), waarna voor elk habitat één mengmonster van 1 liter is gemaakt op basis van de tien deelmonsters van 100 ml. Elk mengmonster is vervolgens gefiltreerd voor het verzamelen van het eDNA (foto 2.2). Tijdens de meetcampagne seizoen zijn in totaal 162 eDNA monsters verzameld in de drie waterlichamen.

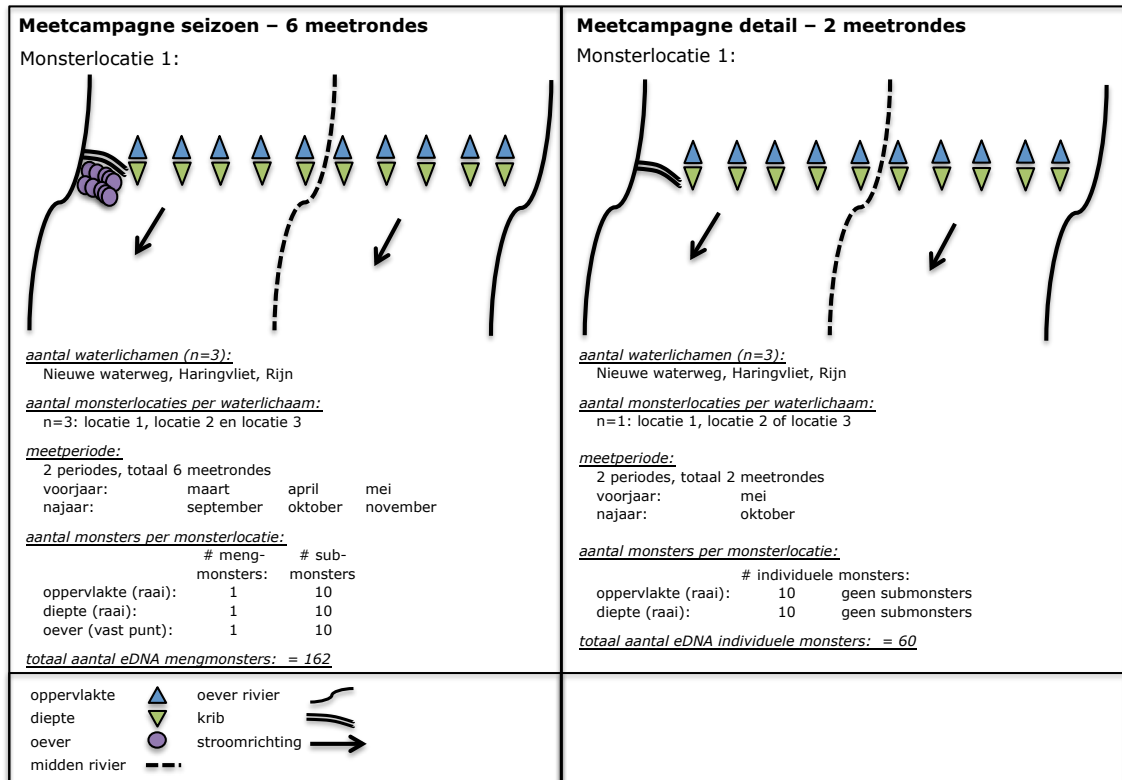
2.2.2 Meetcampagne detail

Tijdens de gedetailleerde meetcampagne zijn uitsluitend individuele eDNA monsters verzameld om inzicht te verkrijgen in ruimtelijke variatie van de visgemeenschap. Deze monsters zijn op hetzelfde moment genomen als de mengmonsters uit de meetcampagne



seizoen (2.2.1). Op deze wijze kunnen de eDNA resultaten van individuele monsters vergeleken worden met de resultaten van mengmonsters. De frequentie van bemonstering is echter lager: de meetcampagne detail is éénmaal in het voorjaar (mei) en éénmaal in het najaar (oktober) in alle drie de waterlichamen uitgevoerd. Daarnaast is per waterlichaam één monsterlocatie bemonsterd in plaats van drie (figuur 2.4).

De afzonderlijke individuele monsters zijn simultaan tijdens de bemonstering van de raaien voor de seizoensgebonden meetcampagne bemonsterd. Dit heeft geresulteerd in 20 individuele monsters per onderzoeklocatie per seizoen, tien voor de raai aan het oppervlakte en tien nabij de bodem (figuur 2.4). Deze individuele monsters geven inzicht in de ruimtelijke verspreiding van eDNA in een raai over de breedte van de rivier. Daarnaast geven de individuele monsters aan hoeveel deelmonsters noodzakelijk zijn om een compleet beeld van de soortenrijkdom te verkrijgen (door het construeren van een soortenverzadigingscurve). Tijdens de meetcampagne detail zijn in totaal 120 eDNA monsters verzameld in de drie waterlichamen.



Figuur 2.4. Schematische weergave meetcampagne seizoen (links) en meetcampagne detail (rechts). Weergegeven is een theoretische dwarsdoorsnede van de rivier met (sub)monsters voor een raai aan de oppervlakte, raai op diepte nabij de bodem en een vast punt vanaf de oever (bijv. een krib).

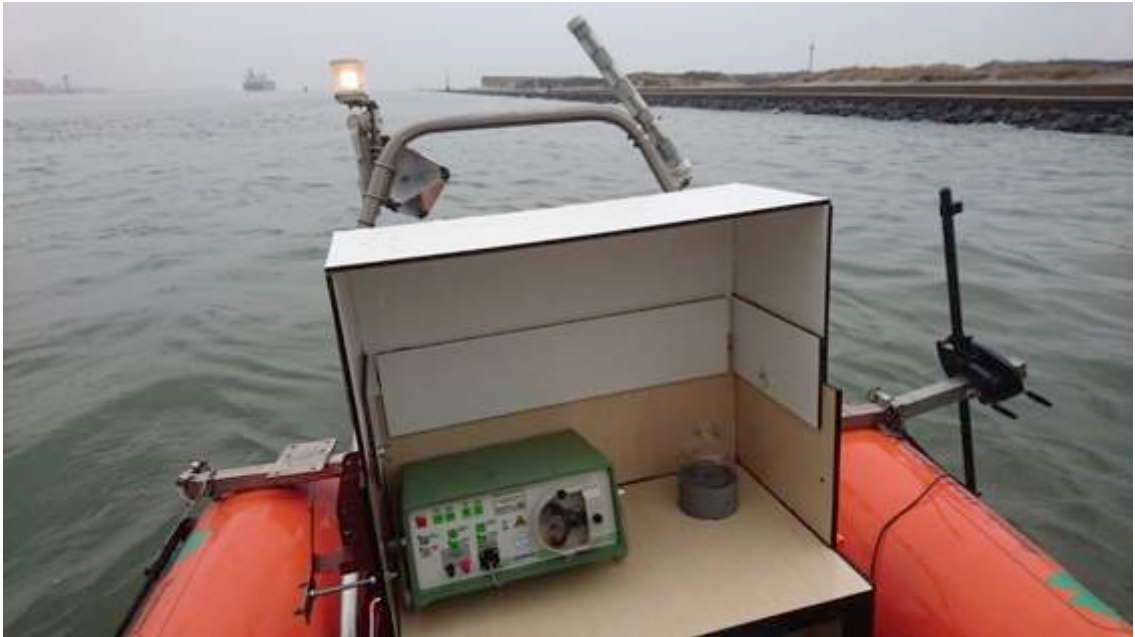


Foto 2.1. Peristaltische pomp op werktafel aan boord onderzoekvaartuig.



Foto 2.2. Filtreeropstelling aan boord van onderzoekvaartuig.



2.2.3 Controlemeting

Tijdens de monstercampagne zijn controlemetingen uitgevoerd. Om mogelijke vals positieve waarnemingen te detecteren is tijdens elke bemonsteringsdag naast de reguliere monstername, een controlemonster in het veld op eenzelfde wijze gefiltreerd als de verzamelde rivierwatermonsters. Voor deze controlemonsters is DNA-vrij water gebruikt.

2.2.4 Omgevingsvariabelen

Tijdens de monstercampagnes zijn bij het verzamelen van de eDNA monsters per locatie ook watermonsters (verder genoemd meetmonsters) genomen om enkele omgevingsvariabelen te meten: troebelheid (met een draagbare TriLux fluorometer), EGV (saliniteitsmeter) en watertemperatuur (oppervlakte). Troebelheid vormt een maat voor zwevend stof en is mogelijk gerelateerd aan inspoeling van water in de rivier en kan de concentratie eDNA (en daarmee trefkans) beïnvloeden terwijl de aan- of afwezigheid van zoutwatervissen waarschijnlijk afhankelijk is en correleert met de saliniteit. Daarnaast heeft ook de waterstroomsnelheid mogelijk effect op het eDNA signaal (verdunning, herkomst). Tenslotte kan ook watertemperatuur een belangrijke variabele zijn die enerzijds effect heeft op het eDNA signaal (afbraak) of de activiteit van vissen. Het effect van deze omgevingsvariabelen is in de statistische analyses als factor meegenomen per verzameld eDNA monster.

Tijdens de monstercampagne seizoen is per raai één meetmonster bij beide oevers en één meetmonster in het midden van iedere raai (zowel aan de oppervlakte als nabij de bodem) genomen. Daarnaast is tevens één meetmonster genomen bij het vaste meetpunt. Dit heeft geresulteerd in zeven meetmonsters per monsterlocatie, 21 meetmonsters per onderzoeklocatie per meetronde in totaal.

Tijdens de monstercampagne detail is voor ieder individueel eDNA monster tevens een meetmonster verzameld om genoemde variabelen te meten. Dit heeft geresulteerd in 20 meetmonsters per onderzoeklocatie per seizoen.

2.3 Uitvoering bemonsteringen

2.3.1 Monstername

De watermonsters zijn met een steriele slang vanuit het onderzoekvaartuig opgepompt met een peristaltische pomp (foto 2.1). Het opzuigen van water met een slang zorgt dat er geen contact mogelijk is tussen het bemonsterde water, de boot, monsternemer en de open lucht waardoor de kans op contaminatie van het monster met vreemd eDNA kleiner is. Alle locaties zijn vanaf de boot bemonsterd. Ook het vaste punt aan de oever is vanaf de boot bemonsterd voor een goede vergelijkbaarheid van de resultaten.



De slang is na ieder monster vervangen om contaminatie vanuit achtergebleven water in de slang uit te sluiten. Tijdens de monstername is de inzuigopening van de slang op de te gewenste diepte onder het wateroppervlak gebracht met behulp van een gewicht en een touw. Voor de habitats “oppervlakte” en “oever” is de inzuigopening van de slang 10 cm onder het wateroppervlak gebracht. Voor de monstername van het habitat “bodem” heeft de monstername ca. 1 m boven de bodem plaatsgevonden. Tijdens de monstername op diepte is de diepte continue gemeten met een sonar. De sonar geeft de diepte aan, de monsternemer laat de inzuigopening van de slang zakken tot de gewenste diepte (de bodemdiepte afgelezen op de sonar, minus 1 m). Tijdens de monstername lag de boot stil (met stationair draaiende motor, bepaald met een GPS). Bij het habitat oever is de inzuigopening van de slang eveneens 10 cm onder het water gebracht vanaf de boot, maar in de directe nabijheid van een vast punt op de oever (bijv. een krib of aanlegsteiger). Dit resulteert dat de methode van monstername (opzuigen van water met een slang) precies hetzelfde is voor alle monsterlocaties en habitats. Foto 2.3 geeft een schematisch beeld van de stappen die tijdens de monstername in het veld zijn doorlopen.

2.3.2 Mengmonsters en individuele monsters

Voor een mengmonster (meetcampagne seizoen) zijn tien deelmonsters van 100 mL opgevangen en gemengd in een steriele liter pot. Deze liter water is vervolgens gefilterd. Voor individuele monsters (meetcampagne detail) is de liter water van één enkel punt verzameld. Deze liter water is ook in een steriele liter pot gebracht alvorens gefilterd te worden, om de methode gelijk te houden aan die van de mengmonsters.

2.3.3 Filtratie in het veld

De filtratie is in het veld uitgevoerd, waarna het filtermembraan is gefixeerd in CTAB-buffer om de tijdsduur voor afbraak van eDNA na monstername te reduceren. Het water is in de filterunit gegoten en met behulp van een vacuümpomp door het filtermembraan heen getrokken. Het membraan betreft een 0,2µm, 64cm² PES-membraan (Polyethersulfone). De filterunits zijn slechts één keer gebruikt zodat er geen risico is dat eDNA van een eerdere bemonstering op de filterunits aanwezig is. De capaciteit van de filters is groter dan één liter waardoor ook in troebel water één liter water bemonsterd kon worden. Het bemonsterde watervolume is daardoor onder alle omstandigheden hetzelfde.

2.3.4 Negatieve veldcontrole

Hoewel zo steriel mogelijk gewerkt wordt in het veld, is contaminatie tijdens de veldmonstername niet uit te sluiten. Om te bepalen in hoeverre contaminatie door het veldpersoneel en/of de opstelling/boot plaats vindt is, is aan het eind van elke



monsterdag een negatieve veldcontrole uitgevoerd. Hierbij is 1 L DNA vrij water (steriel voorbereid in het laboratorium) door dezelfde filteropstelling gefilterd als de echte veldmonsters. Dit controlemonster wordt vervolgens op dezelfde wijze behandeld en geanalyseerd als alle echte veldmonsters. Indien er geen contaminatie heeft plaatsgevonden wordt er geen vis DNA in de veldcontrole aangetroffen (de veldcontrole is dan dus werkelijk negatief).

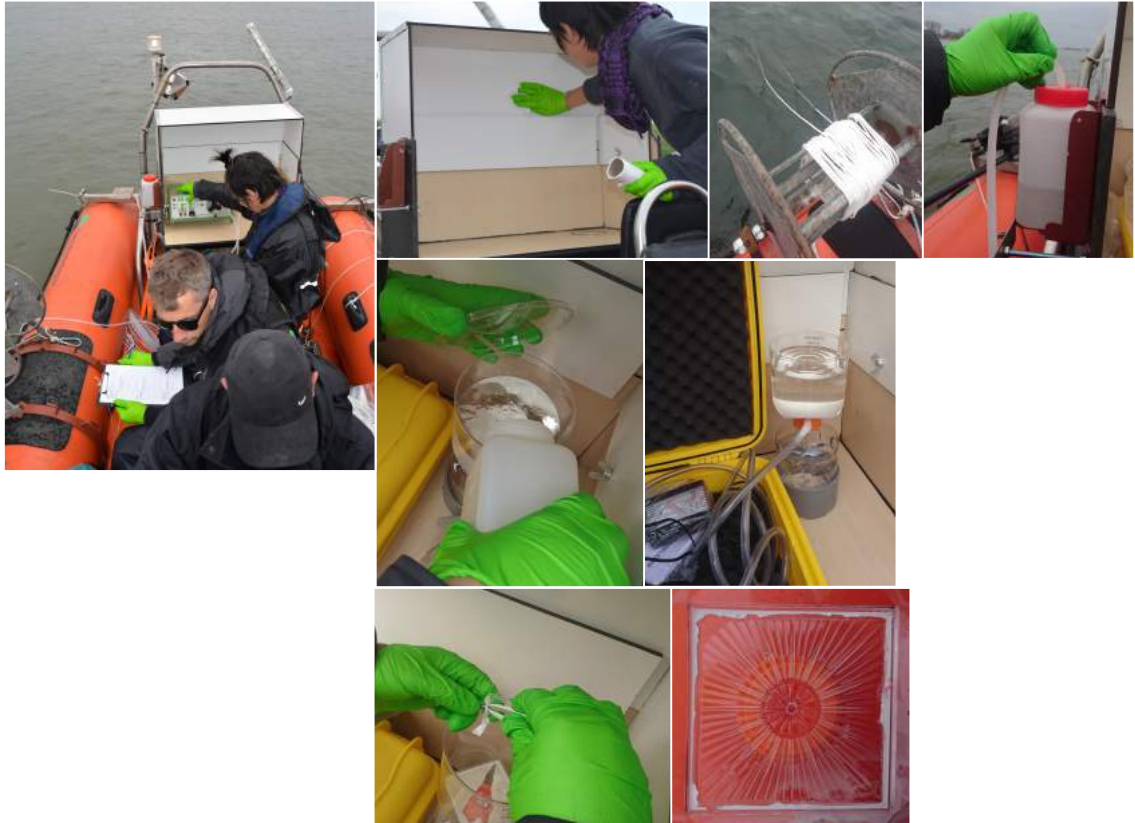


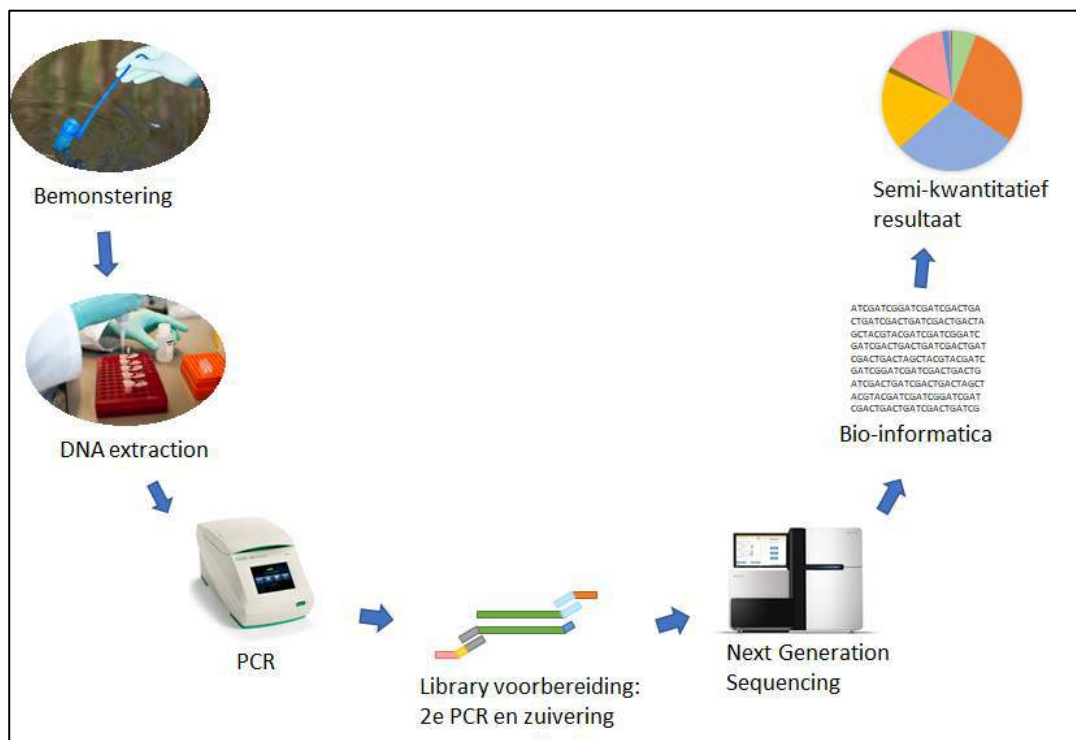
Foto 2.3. *Overzicht van de veldbemonstering. Achtereenvolgens is een overzicht weergegeven van de monsterboot met schipper, assistent en monsternemer, het schoonmaken van de werktafel met een chloor-oplossing, de monsterslang op een wiel die naar de bodem kan zakken, het opzuigen van 100 mL deelmonster in het verzamelvat van 1 L, het overbrengen van het monstervolume (1 L) naar het vacuümfilter, de filtreeropstelling, het overbrengen van het filtermembraan naar een epje met bufferoplossing en de resterende lege filterhouder.*



2.4 Laboratorium werkzaamheden & bio-informatica

Het genereren van vissoortenlijsten in KRW-waterlichamen op basis van eDNA is een precair proces waarin diverse processtappen doorlopen worden. In bovenstaande stappen is de veldmonstername beschreven. Het monster wordt vervolgens in het laboratorium opgewerkt waarbij eDNA isolatie, vermeerdering via PCR en Next Generation Sequencing plaats vindt. Tenslotte vindt er een bio-informatica stap plaats waarbij de gegenereerde DNA-sequenties uit het veldmonster aan vissoorten wordt gerelateerd aan een referentiedatabase en waarbij PCR- en sequencefouten en mogelijke vals positieve detecties worden verwijderd.

Elk stap dient met de nodige voorzichtigheid en kwaliteit uitgevoerd te worden om de uiteindelijke resultaten te waarborgen. In figuur 2.5 zijn alle processtappen samengevat van monstername in het veld tot het genereren van de soortenlijst van vissen.



Figuur 2.5. Processtappen van watermonster tot soortenlijst.

Het proces van eDNA metabarcoding omvat in het laboratorium vier hoofdprocessen. De processen betreffen:

- 1) DNA extractie;
- 2) PCR analyse;
- 3) Next Generation Sequencing;
- 4) Bio-informatica.



2.4.1 DNA extractie

De DNA-extractie is uitgevoerd zoals beschreven in Renshaw *et al.* 2015. Het eDNA is geëxtraheerd middels een phenol-chloroform extractie. Deze extractie techniek is zeer efficiënt en de DNA opbrengst is veel groter ten opzichte van commerciële kolom-gebaseerde extractie kits. De verzadiging van een phenol-chloroform extractie ligt ongeveer factor 2,5 hoger. Om die reden resulteert een phenol-chloroform extractie in hogere eDNA concentratie van vissen, zelfs als er een groter volume water bemonsterd zou worden voorafgaand aan de DNA-extractie.

Het eDNA is reeds in het veld geconcentreerd op het filtermembraan en overgebracht naar een lysis buffer (CTAB). De lysis (laten vrijkomen van het DNA uit het celmateriaal) wordt uitgevoerd middels 10 minuten incubatie bij 65°C;

Organische stoffen worden gescheiden door toevoegen van chloroform-isoamyl alcohol, en daaropvolgende centrifugatie. Vervolgens wordt het DNA neergeslagen middels een ethanol precipitatie. Elutie vindt plaats in 200 µL water waarin het eDNA stabiel blijft.

2.4.2 PCR analyse

De polymerase kettingreactie (Polymerase Chain Reaction, PCR) is een enzymatische reactie waarmee, onder invloed van nauwkeurig gecontroleerde temperatuurwisselingen (cycli), een kenmerkend DNA-fragment (merker) tot hoge aantallen wordt vermenigvuldigd. De PCR is uitgevoerd met 50 cycli. Met behulp van korte synthetische DNA-moleculen (primers) met een DNA-volgorde (sequentie) die overeenkomt met vissen kan in de PCR een DNA-fragment van met name vissen worden vermenigvuldigd (Tabel 2.1). Alle in Nederland voorkomende vissoorten kunnen met de ontwikkelde primers geamplificeerd worden. Om de betrouwbaarheid en replicerbaarheid van de PCRs te garanderen is deze uitgevoerd met 12 replica's. Er is gewerkt met een twee-staps PCR-protocol om specificiteit van de primers te vergroten. Om contaminatie te voorkomen zijn de PCR mixen gepipetteerd in een ruimte waarin geen DNA aanwezig. De eDNA extracten zijn toegevoegd in een ruimte waarin uitsluitend monsters gehanteerd worden met zeer lage concentraties DNA. Alle handelingen zijn uitgevoerd in zeer schone UV-kabinetten met een verticale laminaire flow om besmetting te voorkomen.

Binnen het stappenplan van monsternamen naar sequentie-analyse worden een tweetal PCR stappen uitgevoerd. In de eerste stap worden de barcode fragmenten gevormd en worden de fragmenten gelabeld met een uniek stukje DNA zodat in een later stadium de monsters te onderscheiden zijn. In de tweede stap worden de fragmenten voorzien van sequencing adapters zodat de fragmenten gesequenced kunnen worden.



Tabel 2.1: Sequenties van de primers die gebruikt zijn voor amplificatie van het eDNA van vissen door Datura Molecular Solutions en KWR. Het eerste deel (5' end primer) betreft de sequencing-adapter. Deze wordt gevolgd door zeven nucleotiden die samen in ieder monster een unieke index vormen. Daarna volgt het deel van de primer dat hecht aan het 12S/16S eDNA van vissen.

DATURA	
16S PRIMERS FW 5'→3'	
Datura_16S_f	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGXXXXXXXXCGAGAAGACCCDTGGRAGCTT
PRIMERS REV 5'→3'	
Datura_16S_r	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGXXXXXXXXGYGGTYGCCCCAACCRAA
12S PRIMERS FW 5'→3'	
Datura_12S_f	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGXXXXXXXXCYGGGATTAGATACCCCRCTATG
PRIMERS REV 5'→3'	
Datura_12S_r	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGXXXXXXXXCGYCARGTCCTTTGGGTTTYAA
KWR	
16S PRIMERS FW 5'→3'	
16SF1	GACGAGAAGACCCTATGAAG
16SF3	GACGAGAAGACCCTATGGAG
16SF4	GACGAGAAGACCCTGTGGAG
PRIMERS REV 5'→3'	
16SR1	GGTCGCCCAACCGAAG
16SR2	GGTCGCCCAACCAAAG.
16SR3	GCAGTCGCCCAACTGAAG
16SR4	CGTCGTCGTGGATATTACTTTTG
16SR6	TGGTCACCCCAACCGAAG
16SR7	GGTCGCCCAACCTAAG

2.4.3 Next Generation Sequencing & bio-informatica

Het proces van eDNA metabarcoding omvat in het laboratorium vier hoofdprocessen. De processen betreffen:

- 1) Next Generation Sequencing;
- 2) Verwerking Illumina paired-end data;
- 3) Sequentie analyse in de Obitools pipeline;
- 4) Threshold filtering in de Python pipeline.

Stap 2 t/m 4 vallen onder de omschrijving 'bio-informatica'. In Bijlage I zijn tabellen opgenomen waarin alle stappen tussen het isoleren van het eDNA uit het veldmonsters tot en met de bio-informatica benoemd en beknopt toegelicht zijn.

De bio-informatica is op twee manieren uitgevoerd. Er is een vergelijking gemaakt tussen een zeer conservatieve filtering en een progressieve filtering. Bij een conservatieve filtering worden vervuilingen, zoals een lage concentratie vals positief eDNA die kunnen ontstaan door lozingen van ballastwater, worden zeer effectief verwijderd, maar ook vermoedelijk correct positieve waarnemingen worden verwijderd. Een progressieve filtering resulteert in een vollediger soortenlijst, maar de kans dat vervuilingen behouden blijven is groter. In de rapportage is gebruik gemaakt van de conservatieve filtering. In bijlagen VI is een



voorbeeld van een monster opgenomen waaruit inzichtelijk wordt wat het effect is van de toegepaste filterstappen.

2.4.4 Duplo analyse

Voor de duplo analyse is samengewerkt door twee laboratoria, KWR en Datura. Om effecten van methodische verschillen op gegenereerde vissoortenlijsten inzichtelijk te maken zijn van 30 monsters uit het meetplan (tien willekeurige monsters per waterlichaam, excl. controlemonsters) duplo analyses uitgevoerd, van elk betreffend monster één duplo door het laboratorium van Datura, de ander duplo door het laboratorium van KWR. De mate van overeenkomst tussen de gegenereerde soortenlijsten van beide laboratoria (idealiter 100%) geeft inzicht in hoeverre het laboratorium/procedure van invloed is op de eDNA detectie.

2.4.5 ddPCR

Op voorhand is ervan uit gegaan dat de concentratie eDNA per monster sterk variabel is. De concentratie (e)vis DNA in de veldmonsters is mogelijk gerelateerd aan de trefkans van vissoorten. Om inzicht in dit verband te verkrijgen is voorafgaand aan de NGS stap van alle monsters uit de meetcampagne detail op basis van ddPCR kwantitatief bepaald hoeveel vis DNA in de verzamelde eDNA monsters aanwezig is.

Op basis van deze ddPCR concentratie bepaling kunnen in de meetcampagne detail tot 20 individuele monsters per locatie onderling vergeleken worden (bijv. in relatie tot eDNA concentratie en trefkans van soorten). Daarnaast kan ook temporele variatie in vis DNA concentratie vergeleken worden tussen de meetcampagne detail in het voorjaar en in het najaar.

Digital droplet PCR (ddPCR) is een technologie die het mogelijk maakt om DNA zeer nauwkeurig te kwantificeren zonder gebruik te maken van een DNA kalibratie oplossing. Bij ddPCR wordt een PCR monster (inclusief het enzym en DNA-componenten) opgedeeld in 20.000 uniforme nanoliter druppels. DNA wordt zo opgedeeld dat in een druppel slechts één of geen DNA template aanwezig is en er dus wel of geen PCR reactie plaatsvindt. De druppels worden na de PCR één voor één uitgelezen, waarbij alleen de druppels waarin een PCR reactie heeft plaats gevonden een fluorescent signaal uitzenden. Op die manier kan DNA absoluut gekwantificeerd worden. Door het opdelen van de PCR reactie in druppels zal er tevens minder remming optreden.

2.4.6 Controle efficiëntie PCR en NGS en negatieve veldcontrole

Naast de bovengenoemde ddPCR aanpak zijn de efficiëntie van de PCR en NGS stappen in het labproces gecontroleerd door tijdens de analyse enkele monsters uit een mock-community mee te nemen. Een mock-community is een artificieel



samengesteld DNA-monster met daarin bekende hoeveelheden DNA van 28 zoet- en zoutwatervissoorten (Tabel 2.2). De PCR en NGS-resultaten van deze samengestelde monsters dienen vergelijkbare resultaten op te leveren met de bekende DNA samenstelling van de mock-community. Deze controle geeft inzicht in de efficiëntie van de PCR stappen en de juiste werking van de NGS-methode voor tenminste de vissoorten in de Mock-community. De controle is een maat voor het al dan niet voorkomen van vals negatieve detecties (eDNA van een vissoort komt wel in het veldmonster voor maar wordt niet opgepikt door fouten in het labproces of de bio-informatica procedure).

Om de mate van contaminatie te bepalen tijdens de veldmonsternamen is aan het eind van elke monsterdag een negatieve veldcontrole verzameld (zie § 2.3.4).

Tabel 2.2. Overzicht van de vissoorten in de Mock-community.

Vissoorten in de Mock-community	
Baars	Europese meerval
Beekforel	Pontische stroomgrondel
Bermpje	Rode Poon
blankvoorn	Schar
Bot	Snoek
Driedoornige stekelbaars	Snoekbaars
Grauwe poon	Spiering
Haring	Tarbot
Horsmakreel	Tong
Karper	Tongschar
Kesslers grondel	Wijting
Kleine modderkruiper	Zalm
Kroeskarper	Zeebaars
Kwabaal	Zonnebaars



2.4.7 Data-analyse

Verwerking van de data en presentatie van de gegevens in tabellen en grafieken is uitgevoerd met behulp van Microsoft Excel, R (versie 3.4.1) en R-Studio (versie 1.0.143) (R Core Team 2017).

Voor de analyse van de gegevens zijn de seizoensmetingen en detailmetingen gescheiden. Alleen vissoorten die tot op soortnaam konden worden gebracht zijn meegenomen in de analyses. Voor het bepalen van de doelsoorten per waterlichaam zijn de volgende KRW watertypes aangehouden: KRW-R8 voor Haringvliet, KRW-O2 voor de Nieuwe Waterweg en KRW-R7 voor de Rijn. Aangezien er geen traditionele monitoringsdata van 2018 beschikbaar waren voor vergelijking met de eDNA monitoring, is de vergelijking uitgevoerd met traditionele monitoringsdata tussen 2012 en 2016.

Venn diagrammen zijn geplotted met de functie *draw.triple.venn()* en *draw.pairwise.venn()* uit de *VennDiagram* package in R. Soortverzadigingscurves zijn geplotted met de functie *specaccum* (matrix, method = "random") uit de *vegan* package. De *jackknife* procedure is uitgevoerd met de functie *jackknife()* uit de *bootstrap* package in R. ANOVA's zijn uitgevoerd met de functie *anova()* wanneer de data voldeden aan de aannames voor ANOVA. De significantie van regressielijnen is getest met de functie *lm()*.



3 Resultaten veldonderzoek eDNA

Leeswijzer

In dit hoofdstuk worden de soortgemeenschappen in de onderzochte waterlichamen tussen eDNA metabarcoding en traditionele passieve en actieve vismonitoring met elkaar vergeleken. Naar verwachting is de genereerde soortenlijst met eDNA metabarcoding soortenrijker dan van de traditionele vismonitoring.

Tevens wordt nagegaan of soorten die in lage dichtheden in de rivier voorkomen (zoals trekvis) ook met eDNA metabarcoding worden aangetoond. Daarnaast wordt ingegaan wat verschillen tussen de drie waterlichamen zijn, en hoe de soortgemeenschap zoals vastgesteld met eDNA metabarcoding varieert in het seizoen tussen voor- en najaar.

Methodische aspecten zoals bemonsteringsinspanning, effecten van habitat en betrouwbaarheid komen in het hoofdstuk 4 aan bod.

3.1 Soortengemeenschap in actieve en passieve vismonitoring

Afbakening van doelsoorten

Doelsoorten zijn afgebakend op basis van de KRW-richtlijn per watertype (Van der Molen et al., 2018): R7 voor langzaam stromende rivier op zand (Rijn), R8 voor zoet getijdenwater (Haringvliet) en O2 voor overgangswateren (Nieuwe Waterweg) (Tabel 3.1).

Soorten waargenomen in actieve en passieve monitoring

Op basis van visgegevens uit de periode 2012-2016 van de actieve en passieve vismonitoring is een overzicht gemaakt van de aangetroffen doelsoorten in de drie waterlichamen (Tabel 3.2). Enkele doelsoorten zijn niet waargenomen tijdens de actieve en passieve monitoring in de periode 2012-2016, waaronder barbeel, bittervoorn, elft, kleine modderkruiper, kopvoorn, kwabaal en rietvoorn in het Haringvliet, snoek in de Nieuwe Waterweg en elft en zeeprick in de Rijn.



Tabel 3.1: Lijst doelsoorten per waterlichaam/KRW watertype.

	Rijn KRW R7	Haringvliet KRW R8	Nieuwe Waterweg KRW O2	soort	Rijn KRW R7	Haringvliet KRW R8	Nieuwe Waterweg KRW O2	Rijn KRW R7	Haringvliet KRW R8	Nieuwe Waterweg KRW O2
soort				soort						
alver	x	x		rivieronderpad				x	x	
ansjovis			x	rivergrondel				x	x	
Atlantische steur	x	x	x	beek-/riverprik				x	x	x
barbeel	x	x		rode poot						x
bittervoorn	x	x		schar						x
bot	x	x	x	schol						x
botervis			x	serpeling				x		
brakwatergrondel			x	slakdolf						x
dikkopje			x	sneep				x		
diklipharder			x	snoek						
driedoornige stekelbaars	x	x	x	snotolf						x
dunlipharder			x	snotling				x		x
elft	x	x	x	spiering						x
fint		x	x	sprot						x
beek/zeeforel			x	steenbolk						x
geep			x	tarbot						x
gewone pijlstaartrog			x	tong						x
glasgrondel			x	trompetterzeenaald						x
griet			x	vetje				x		
grote zeenaald			x	vijfdradige meun						x
haring			x	vorskwab						x
hamasmannetje			x	wijing						x
houting - complex	x	x	x	winde				x	x	
kabeljauw			x	Atlantische zalm				x		
kleine modderkruiper	x	x	x	zandspiegeling						x
kleine zeenaald			x	zeebaars						x
kopvoorn	x	x		gewone zeedonderpad						x
kwabaal	x	x		zeelt				x	x	
paling	x	x		zeeprik				x	x	
puitaal			x	zeesteekelbaars						x
rietvoorn	x	x	x	Totaal aantal soorten				23	25	46



Tabel 3.2: Overzicht van vissoorten aangetroffen per waterlichaam tijdens de actieve en passieve monitoring in de periode 2012-2016. De trefkans is uitgedrukt in CPU (n/sample). Tevens is per waterlichaam aangegeven welke KRW richtlijn geldt en welke vissoorten als doelsoorten zijn aangemerkt binnen deze richtlijn.

soorten	Haringvliet			Nieuwe Waterweg			Rijn		
	actief	passief	KRW R8	actief	passief	KRW O2	actief	passief	KRW R7
Adderzeenaald					x				
Alver		x					x	x	x
Atlantische horsmakreel				x	x				
Atlantische zalm	x	x	x		x	x		x	x
Baars	x	x			x		x	x	
Barbeel			x					x	x
Beek-/rivierprik	x	x	x	x	x	x		x	x
Beek-/Zeeforel		x			x	x		x	
Bittervoorn			x				x	x	x
Blankvoorn	x	x			x		x	x	
Blauwband								x	
Blauwneus	x								
Bot	x	x	x	x	x	x		x	x
Botervis				x	x	x			
Brakwatergrondel						x			
Brasem	x	x			x		x	x	
Dikkopje	x			x	x	x			
Diklipharder		x			x	x			
Donaubrasem								x	
Driedoornige stekelbaars	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Driedradige meun				x	x				
Dunlipharder		x		x	x	x			
Dwergbolk				x	x				
Dwergtong				x					
Eift		x	x		x	x		x	x
Europese meerval		x			x			x	
Fint		x	x	x	x	x			
Geep					x				
Gehoornde slijmvis					x				
Gevlekte lipvis					x				
Gewone zeedonderpad				x	x	x			
Giebel		x						x	
Glasgrondel	x			x		x			
Grauwe poon				x					
Griet				x	x	x			
Groene zeedonderpad					x				
Grote marene		x						x	
Grote zeenaald	x			x	x	x			
Haring	x			x	x	x			
Harnasmannetje				x	x	x			
Hondshaai					x				
Houting - complex	x	x	x		x	x		x	x
Kabeljauw				x	x	x			
Karper	x	x						x	
Kesslers grondel	x	x			x		x	x	
Kleine marene		x							
Kleine modderkruiper			x				x	x	x
Kleine pieterman				x					
Kleine zeenaald				x	x	x			
Kolblei	x	x			x		x	x	
Koornaarvis	x				x				
Kopvoorn			x					x	x
Kroeskarper								x	
Kwabaal			x					x	x
Makreel					x				
Marmergondel	x	x			x		x	x	



soorten	Haringvliet			Nieuwe Waterweg			Rijn		
	actief	passief	KRW R8	actief	passief	KRW O2	actief	passief	KRW R7
Mul					x				
Paling	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pelser		x			x				
Pijlstaartrog					x				
Pitvis				x	x				
Pontische stroomgrondel	x				x		x	x	
Pos	x	x			x		x	x	
Puitaal				x	x	x			
Rasterpitvis				x					
Regenboogforel					x				
Rivierdonderpad	x	x	x		x				x
Riviergrondel								x	
Rode poon				x		x			
Roofblei		x			x		x	x	
Rietvoorn		x	x					x	x
Schar				x	x	x			
Schelvis					x				
Schol				x	x	x			
Schurftvis				x	x				
Serpeling							x		
Siberische steur								x	
Slakdolf				x		x			
Sneep		x	x		x			x	x
Snoek		x						x	
Snoekbaars	x	x			x		x	x	
Snotolf					x	x			
Spiering	x	x	x	x	x	x		x	
Sprot	x			x	x	x			
Steenbolk				x	x	x			
Tarbot				x	x	x			
Tiendornige stekelbaars					x				
Tong				x	x	x			
Tongschar					x				
Trekkervis					x				
Vetje								x	
Vierdradige meun					x				
Vijfdradige meun				x	x	x			
Vorskwab				x	x	x			
Wijting				x	x	x			
Winde	x	x	x		x		x	x	x
Witte koolvis					x				
Zandspiering				x	x	x			
Zeebaars		x		x	x	x			
Zeeduivel					x				
Zeekarper					x				
Zeelt								x	
Zeeprik	x	x	x	x	x	x		x	x
Zeewolf					x				
Zonnebaars								x	
Zwartbekgrondel	x	x		x	x		x	x	
Zwarte grondel					x				
Zwarte koolvis					x				
Zwartooglipvis					x				
Overig									
Steur sp.		x						x	
Harder ongespecificeerd	x	x			x				



3.2 Soortgemeenschap op basis van eDNA metabarcoding

In dit onderzoek is gebruik gemaakt van twee DNA targetregio's waarop specifieke primers ontworpen zijn; de 12S en 16S regio's. Op basis van eDNA zijn dus twee soortenlijsten gegenereerd. In onderstaande paragraaf worden beide soortenlijsten tegen elkaar afgezet en aansluitend vergeleken met de vangsten uit de passieve en actieve vismonitoring. Op basis van de dekking van de 12S en 16S primers sets voor soortenrijkdom (soorten en doelsoorten), als ook praktische overwegingen, zal een keuze worden gemaakt voor een primerset die in het vervolg van deze rapportage zal worden uitgewerkt.

Voor de analyse van soortenrijkdom (soorten en doelsoorten) is enkel gebruik gemaakt van soorten die tot op soort-niveau gedetecteerd zijn. Wanneer geen onderscheid gemaakt kon worden tussen verwante soorten, zijn deze detecties opgenomen onder het kopje "overige". Bijvoorbeeld, gibel en goudvis zijn aangemerkt als aparte soorten in de referentiedatabase van Datura Molecular Solutions, KWR heeft ze aangemerkt als één soort.

Zoals uit onderstaande tabel 3.3 blijkt zijn er de nodige overeenkomsten maar ook de nodige verschillen aangetroffen tussen de twee DNA-methodes. Op basis van 12S zijn in het Haringvliet 27 soorten, in de Nieuwe Waterweg 42 en in de Rijn 33 soorten aangetoond. Op basis van het 16S zijn in het Haringvliet 35 soorten, in de Nieuwe Waterweg 66 en in de Rijn 41 soorten aangetoond

Op basis van het 16S zijn beduidend meer soorten aangetroffen en bovendien zijn alle doelsoorten zoals hierboven gedefinieerd aangetoond. Slechts in enkele gevallen heeft de 12S methode meer informatie opgeleverd dan alleen op basis van 16S gegenereerd werd. Zoals de rietvoorn die in de Rijn alleen gedetecteerd is met 12S. Ook zeelt, riviergrondel en vetje zijn alleen gedetecteerd met 12S in het Haringvliet.



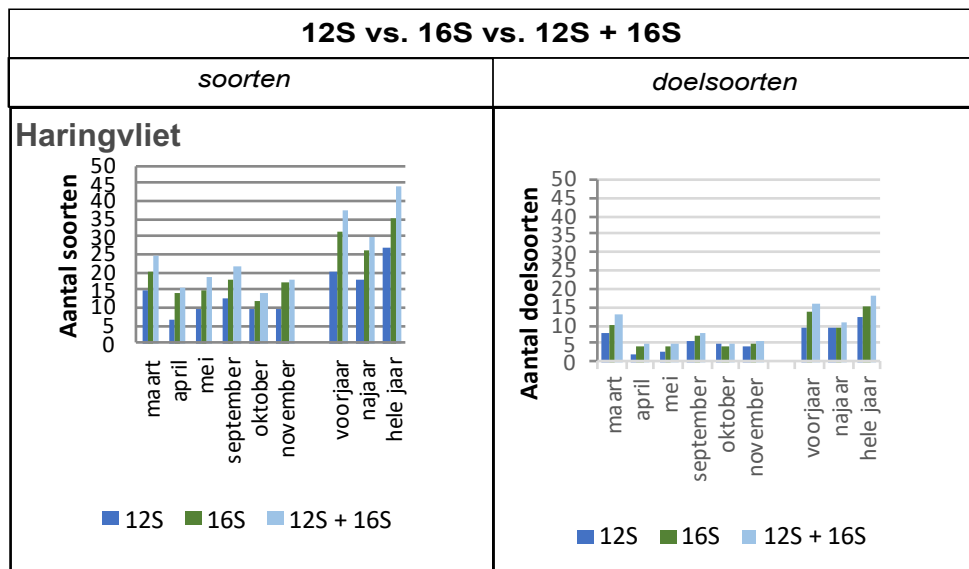
Tabel 3.3: Totale soortenlijst per waterlichaam zoals gedetecteerd met 12S, 16S en de combinatie van 12S en 16S in eDNA monsters genomen tijdens de seizoensbemonstering. Tevens is aangegeven of de soort een doelsoort is in het betreffende waterlichaam.

	Haringvijlet		Nieuwe Waterweg		Rijn		Haringvijlet		Nieuwe Waterweg		Rijn	
	12S	12S & 16S	12S	12S & 16S	12S	12S & 16S	12S	12S & 16S	12S	12S & 16S	12S	12S & 16S
soorten												
alver		+		+		+		+		+		+
ansjovis												
Atlantische zalm	+	+		+		+		+		+		+
baars		+		+		+		+		+		+
barbeel		+		+		+		+		+		+
beek-/riviervik	+	+		+		+		+		+		+
beek/zeeforel		+		+		+		+		+		+
beekdonderpad		+		+		+		+		+		+
bermple		+		+		+		+		+		+
biltervoorn		+		+		+		+		+		+
blankvoorn		+		+		+		+		+		+
botervis		+		+		+		+		+		+
brakwatergondel		+		+		+		+		+		+
brasem		+		+		+		+		+		+
dikkopje		+		+		+		+		+		+
diklipharer		+		+		+		+		+		+
Donaubrasem		+		+		+		+		+		+
driedoornige stekebaars	+	+		+		+		+		+		+
dunlipharer		+		+		+		+		+		+
oevergong		+		+		+		+		+		+
efft		+		+		+		+		+		+
elrits		+		+		+		+		+		+
Europese meerval		+		+		+		+		+		+
Europese sardien		+		+		+		+		+		+
Europese zeebaars		+		+		+		+		+		+
fiat		+		+		+		+		+		+
geep		+		+		+		+		+		+
genoemde slijmvis		+		+		+		+		+		+
gestippelde alver		+		+		+		+		+		+
gewone slijmvis		+		+		+		+		+		+
gewone zeedonderpad		+		+		+		+		+		+
goudharer		+		+		+		+		+		+
goudvis		+		+		+		+		+		+
gaskarper		+		+		+		+		+		+
griet		+		+		+		+		+		+
groene zeedonderpad		+		+		+		+		+		+
grote zeenaald		+		+		+		+		+		+
haring		+		+		+		+		+		+
harnasmannetje		+		+		+		+		+		+
houtling - complex		+		+		+		+		+		+
kabeljauw		+		+		+		+		+		+
karper		+		+		+		+		+		+
Kesslers grondel		+		+		+		+		+		+
kleine modderkuiper		+		+		+		+		+		+
kleine zeenaald		+		+		+		+		+		+
Totaal aantal soorten	12	35	12	38	11	66	18	45	35	70	41	21

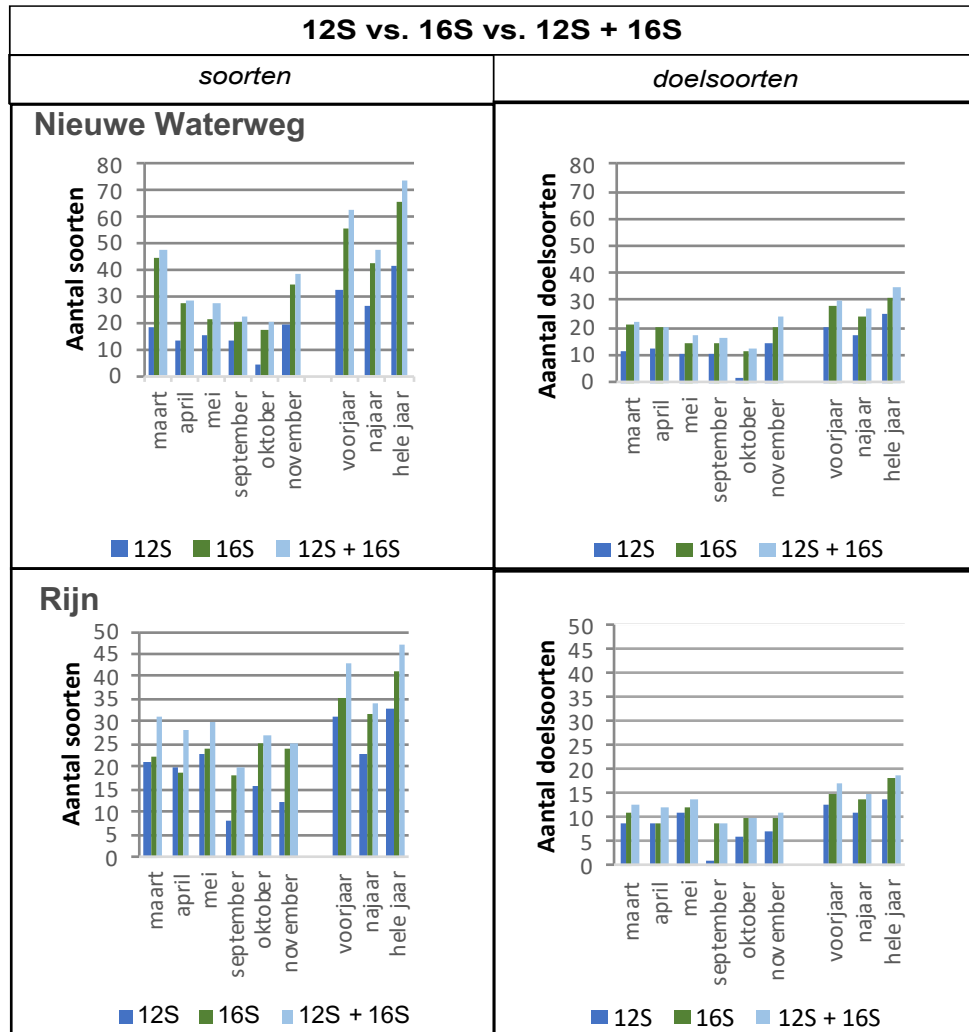


In onderstaande figuur (Figuur 3.1) is het aantal soorten totaal en de doelsoorten zoals aangetoond op basis van 12S, 16S en de combinatie van 12S en 16S uitgezet per locatie gedurende de maanden waarin in 2018 het onderzoek is uitgevoerd. Uit onderstaande figuren ontstaat eveneens het beeld dat het aantal soorten dat opgepikt wordt met 16S hoger is dan op basis van 12S en nog hoger bij het gebruik van beide primers (12S + 16S).

Het gebruik van data van twee targetregionen (12S en 16S), waarbij niet alle soorten op beide regionen gedetecteerd kunnen worden, is van invloed op de detectiekans van afzonderlijke soorten. Echter, de primer sets kunnen elkaar ook aanvullen: ook wanneer een soort in beide referentiedatabases voorkomt, kan deze soort in sommige gevallen met de ene primerset wel en de andere niet gedetecteerd worden.



Figuur 3.1: Totaal aantal soorten en doelsoorten gevonden op 12S (donkerblauwe balken) en 16S (groene balken) en de combinatie van 12S en 16S (lichtblauwe balken) gedurende het jaar voor de waterlichamen de Haringvliet en de Nieuwe Waterweg.



Vervolg figuur 3.1: Totaal aantal soorten en doelsoorten gevonden op 12S (donkerblauwe balken) en 16s (groene balken) en de combinatie van 12S en 16S (lichtblauwe balken) gedurende het jaar voor het waterlichaam de Rijn.

Ogenscheinlijk leidt de combinatie van 12S en 16S tot een hoger aantal gedetecteerde soorten en doelsoorten, echter leidt het mogelijk ook tot een (niet inzichtelijke) vergroting van ongelijke kansen op detectie tussen vissoorten die bv. wel met 12S en niet met 16S te detecteren zijn. Andere zaken van invloed op detectie zijn o.a. primerefficiëntie en eDNA concentratie van het eDNA target in het monster.

In het vervolg van deze rapportage is ervoor gekozen om alleen de data van 16S verder uit te werken omdat 16S een hogere resolutie biedt dan 12S.

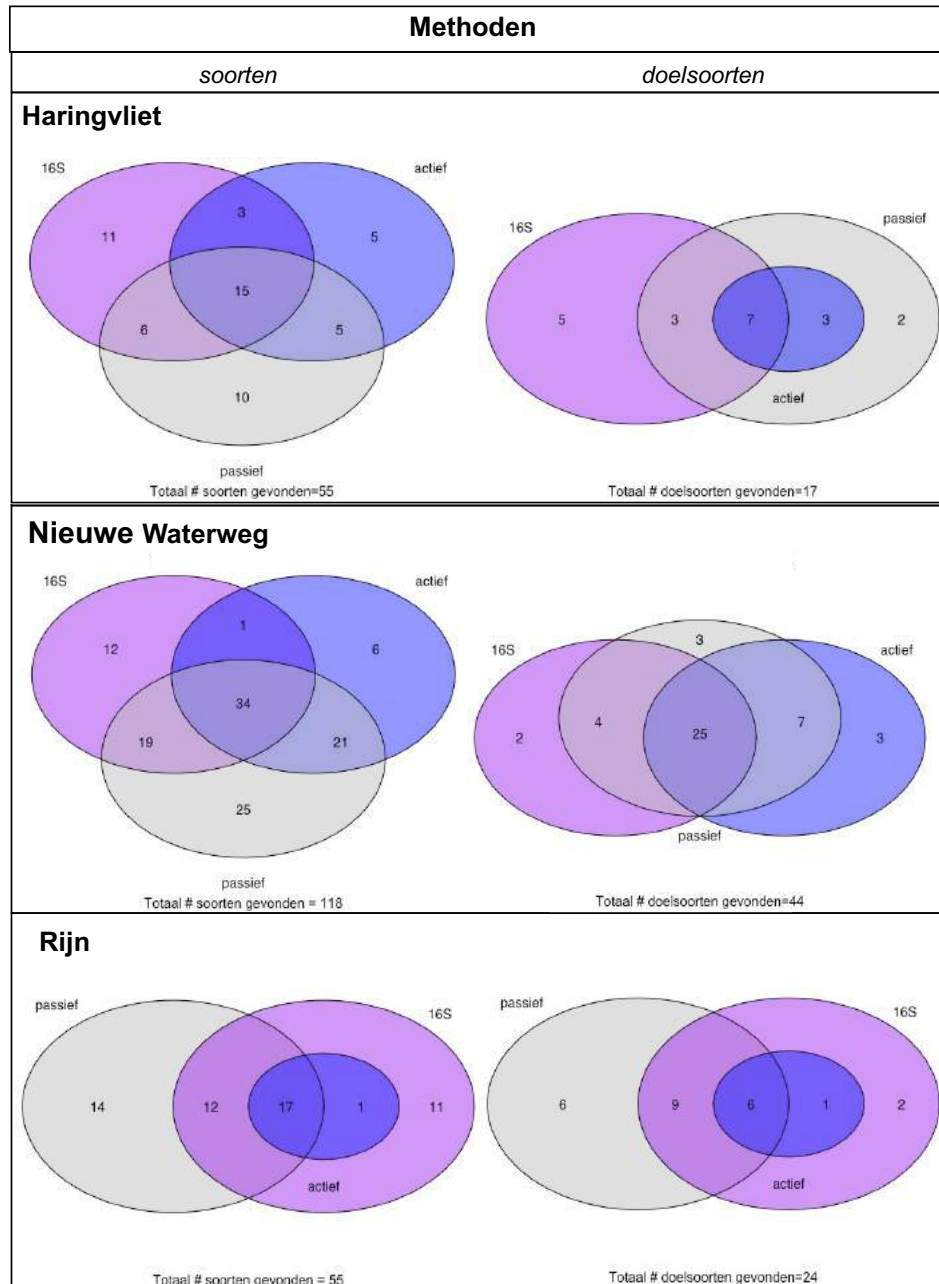


3.3 Vergelijking eDNA en traditionele monitoring

In figuur 3.2 is voor alle drie de waterlichamen in beeld gebracht wat overeenkomsten en verschillen zijn tussen de toegepaste monitoringstechnieken; 16S (conservatieve filtering), actieve en passieve vismonitoring. Hiertoe zijn de eDNA monitoringsresultaten uit 2018 vergeleken met vier jaar traditionele vismonitoring data uit de periode 2012-2016, aangezien er in 2018 geen bevissingsgegevens zijn verzameld. De resultaten van deze vergelijking moeten dus in deze context worden geïnterpreteerd.

In de figuren wordt onderscheid gemaakt tussen het totaal aantal aangetroffen soorten en het aantal doelsoorten. Uit nagenoeg alle figuren valt op te maken dat elke methode afzonderlijk unieke soorten vangt/detecteert. Een deel van de soorten wordt ook met één of beide andere methodieken gevangen/gedetecteerd. In het Haringvliet worden er bijvoorbeeld op basis van de totale soortenlijst in de actieve monitoring 5 unieke soorten aangetoond, 5 soorten zijn tevens gevangen in de passieve vismonitoring en 3 soorten zijn tevens aangetoond op basis van 16S. Voor 15 soorten die gevangen zijn in de actieve vismonitoring geldt dat ze ook gevangen zijn in de passieve vismonitoring én zijn aangetoond op basis van 16S. Middels eDNA wordt enkel in het Haringvliet het hoogst aantal unieke (doel)soorten aangetroffen. In de Nieuwe Waterweg en de Rijn is het hoogst aantal unieke (doel)soorten aangetroffen middels de passieve vismonitoring. Het aantal soorten dat met alle drie de methoden aangetoond wordt is beperkt.

In deze figuren is uitsluitend gebruik gemaakt van 16S data welke conservatief gefilterd zijn. Indien in de toekomst gebruik gemaakt wordt van een combinatie van 12S en 16S en een progressieve bio-informatica filtering gehanteerd wordt, dan zal de overlap van eDNA detectie met andere methodieken aanzienlijk groter zijn.



Figuur 3.2: Venn diagrammen van overeenkomstige en unieke soorten aangetroffen met behulp van verschillende bemonsteringsmethoden (traditionele actieve monitoring in periode 2012-2016: blauw cirkel, traditionele passieve monitoring in periode 2012-2016: grijze cirkel en eDNA metabarcoding van de 16S regio 2018: paarse cirkel) voor water lichaam Haringvliet. Twee overlappende cirkels geven twee methoden aan waarmee dezelfde soorten zijn aangetroffen, de zone waar drie cirkels overlappen geven het aantal soorten weer dat met alle bemonsteringsmethodes is aangetroffen. Het linker figuur geeft het totaal aantal soorten en het rechter figuur het totaal aantal doelsoorten dat aangetoond is.



Detectie en vangst doelsoorten

In tabel 3.4 wordt per waterlichaam de detectie van doelsoorten in eDNA monsters vergeleken met de vangst van doelsoorten in traditionele monitoring (actieve en passieve vismonitoring). Doelsoorten, zoals alver en driedoornige stekelbaars in het Haringvliet worden aangetoond met eDNA metabarcoding, terwijl de soorten niet altijd met traditionele monitoring worden aangetoond.



Tabel 3.4: Overzicht van de aanwezigheid van de doelsoorten per waterlichaam met behulp van eDNA metabarcoding van de 16S regio, actieve monitoring en passieve monitoring.

Haringvliet - doelsoorten (R8)			Nieuwe Waterweg - doelsoorten (O2)			Rijn - doelsoorten (R7)					
	16S	actief	passief		16S	actief	passief		16S	actief	passief
Alver	x			Ansjovis	x			Alver	x		
Atlantische zalm	x	x		Atlantische zalm	x			Atlantische zalm	x	x	x
Barbeel	x			Beek-/rivierprik	x	x		Barbeel	x		
Beek-/rivierprik	x	x		Beek-/zeeforel	x			Beek-/rivierprik	x		x
Beekdonderpad	x			Bot	x	x		Beekdonderpad	x		x
Bittervoorn	x			Botervis	x	x		Bittervoorn	x	x	x
Bot		x		Brakwatergrondel	x			Bot			x
Driedoornige stekelbaars	x	x		Dikkopje	x	x		Driedoornige stekelbaars	x	x	x
Elft				Diklipharder	x			Elft			x
Fint				Driedoornige stekelbaars	x	x		Houting - complex	x		x
Houting - complex	x	x		Dunipharder	x	x		Houting - complex	x		x
Kleine modderkruiper	x			Elft	x	x		Kleine modderkruiper	x	x	x
Kleine modderkruiper - hybride				Europese zeebaars	x			Kleine modderkruiper - hybride			
Kopvoorn				Fint	x	x		Kopvoorn	x		x
Kroeskarper				Geep	x			Kroeskarper			
Kwabaal				Gewone zeedonderpad	x	x		Kwabaal			x
Paling	x	x		Glasgrondel	x			Paling	x	x	x
Rietvoorn	x			Goudharder	x			Rietvoorn			x
Rivierdonderpad		x		Griet	x	x		Rivierdonderpad	x		
Riviergrondel				Grote zeenaald	x	x		Riviergrondel	x		x
Serpeling	x			Haring	x	x		Serpeling	x		x
Sneep	x			Hamasmannetje	x	x		Sneep			
Spiering	x	x		Houting - complex	x	x		Spiering			
Veije				Kabeljauw	x	x		Veije			
Winde	x	x		Kleine zeenaald	x	x		Winde	x	x	x
Zeelt				Paling	x	x		Zeelt			
Zeeprik		x		Puitaal	x	x		Zeeprik	x		x
				Rode poot		x					
				Schar		x					
				Schol		x					
				Slakdolf		x					
				Snoek							
				Snotlof							
				Spiering		x					
				Sprot		x					
				Steenbolk		x					
				Tarbot		x					
				Tong		x					
				Vijftradige meun		x					
				Vorskwab		x					
				Wijting		x					
				Zandspiering		x					
				Zeebaars		x					
				Zeeprik		x					

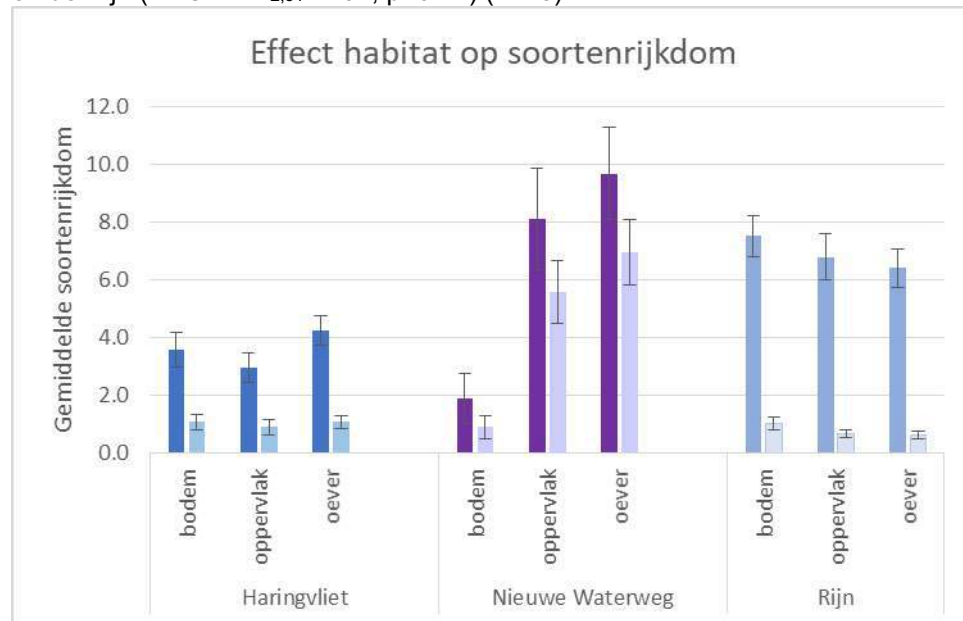


3.3 Variatie soorten op basis van eDNA metabarcoding

3.3.1 Variatie soortenrijkdom per habitat

Habitattype (bodem, oever of oppervlakte; Figuur 3.3) heeft een significant effect op de gemiddelde aantal soorten (gemiddelde soortenrijkdom, n=18) in de Nieuwe Waterweg (ANOVA: $F_{2,51}=7.9$, $p<0.01$). Het gemiddeld aantal soorten in het habitat bodem was significant lager vergeleken met de habitats oppervlakte en oever ($p<0.05$). Er is geen significant effect van habitat type op de gemiddelde soortenrijkdom in het Haringvliet (ANOVA: $F_{2,51}=1.49$, $p=0.26$) en de Rijn (ANOVA: $F_{2,51}=0.61$, $p=0.55$) (n=18) gevonden.

Habitattype heeft een significant effect op het gemiddelde aantal doelsoorten in de Nieuwe Waterweg (ANOVA: $F_{2,51}=11.56$, $p<0.0001$), Het gemiddeld aantal doelsoorten in het habitat bodem was significant lager vergeleken met de habitats oppervlakte ($p<0.01$) en oever ($p<0.0001$). Er is geen significant effect van habitat type op het gemiddelde aantal doelsoorten in het Haringvliet ($F_{2,51}=0.15$, $p=0.86$) en de Rijn (ANOVA: $F_{2,51}=1.54$, $p=0.22$) (n=18).



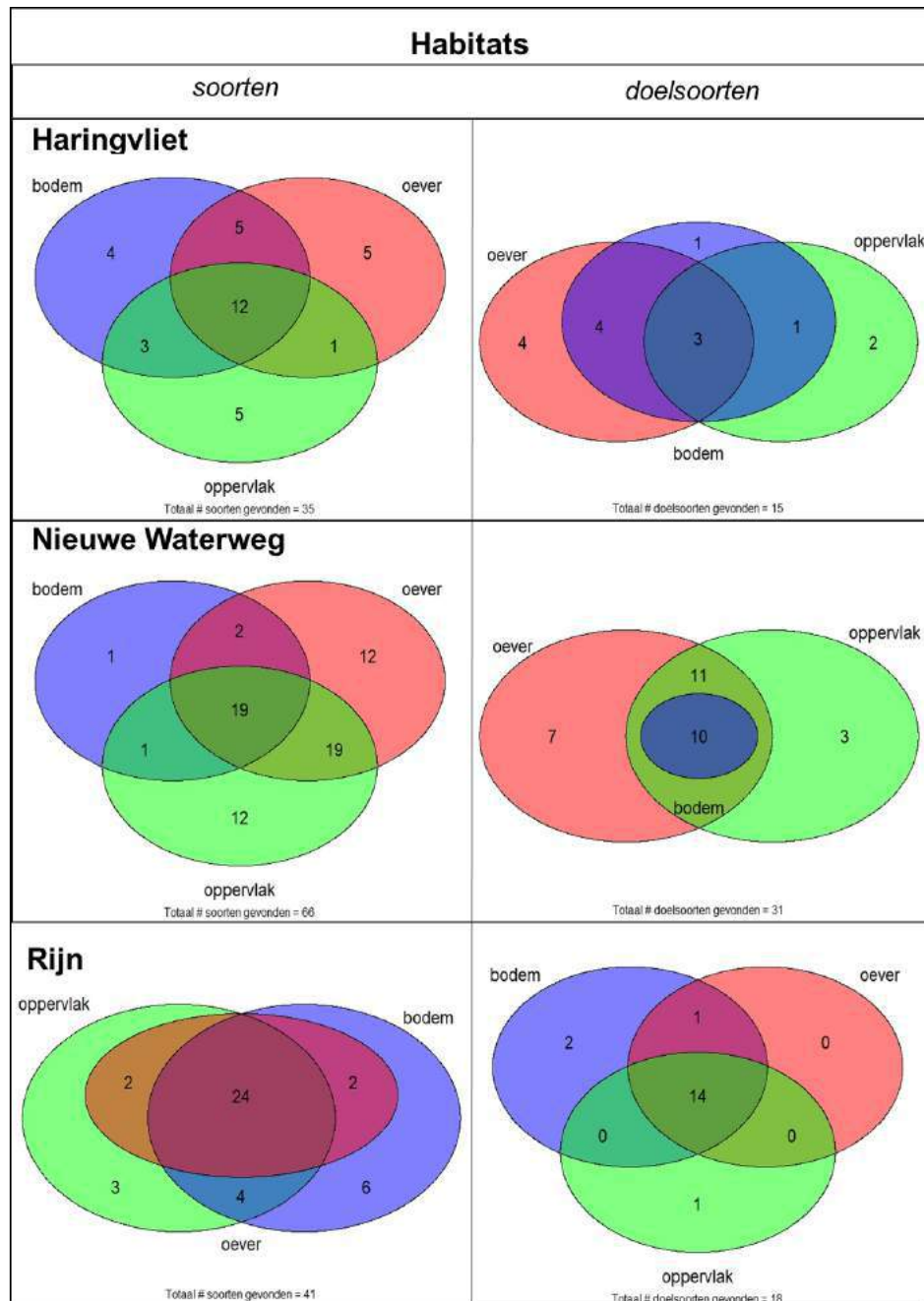
Figuur 3.3: Effect van habitat (bodem, oever, oppervlakte) op de gemiddelde soortenrijkdom van het Haringvliet, de Nieuwe Waterweg en de Rijn. Per waterlichaam en habitat, geeft de linker (donkergekleurde) staaf het gemiddelde soortenrijkdom weer en de rechter (lichtergekleurde) staaf het gemiddeld aantal doelsoorten. Dit betreft 16S data welke conservatief gefilterd is.

Net als iedere methode afzonderlijk unieke soorten detecteert/vangt (Figuur 3.2) worden op basis van 16S ook in elk afzonderlijk habitat unieke soorten gedetecteerd (Figuur 3.4), zowel voor totaal aantal soorten als totaal aantal doelsoorten. Desondanks geeft het habitat bodem het meest complete soortenbeeld in het Haringvliet (24 van 35 soorten) en de Rijn (36 van 41 soorten).



Terwijl in de Nieuwe Waterweg juist het habitat oppervlak het meest representatief is (51 van 66 soorten).

In het habitat oever worden in het Haringvliet en de Nieuwe Waterweg de meeste doelsoorten gedetecteerd (Figuur 3.4, rechterfiguren): 11 van 15 doelsoorten in het Haringvliet en 28 van 31 doelsoorten in de Nieuwe Waterweg. In de oever van de Rijn worden 15 van de 18 doelsoorten aangetroffen, terwijl in het habitat bodem 17 van de 18 soorten zijn gedetecteerd (Figuur 3.4).



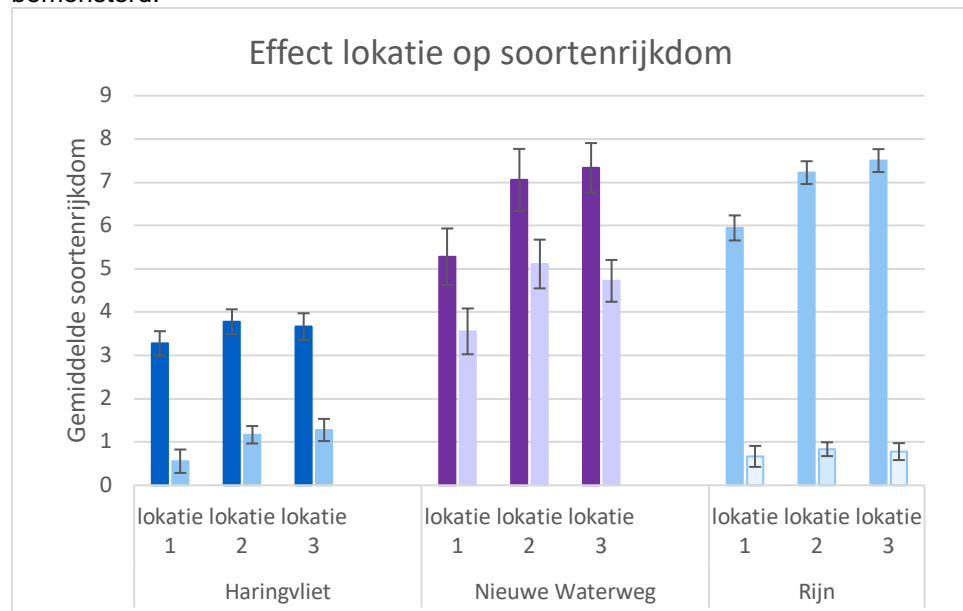
Figuur 3.4: Overzicht van overeenkomstige en unieke soorten tussen habitats (oever, bodem, oppervlak) voor elk waterlichaam (Haringvliet, Nieuwe Waterweg, Rijn). Twee overlappende cirkels geven twee habitats aan waarin dezelfde soorten zijn aangetroffen, de zone waar drie cirkels overlappen geven het aantal soorten weer dat in alle habitats is aangetroffen. Het linker figuur geeft het totaal aantal soorten en het rechter figuur het totaal aantal doelsoorten. Deze figuur is samengesteld op basis van alleen 16S data welke conservatief gefilterd is.



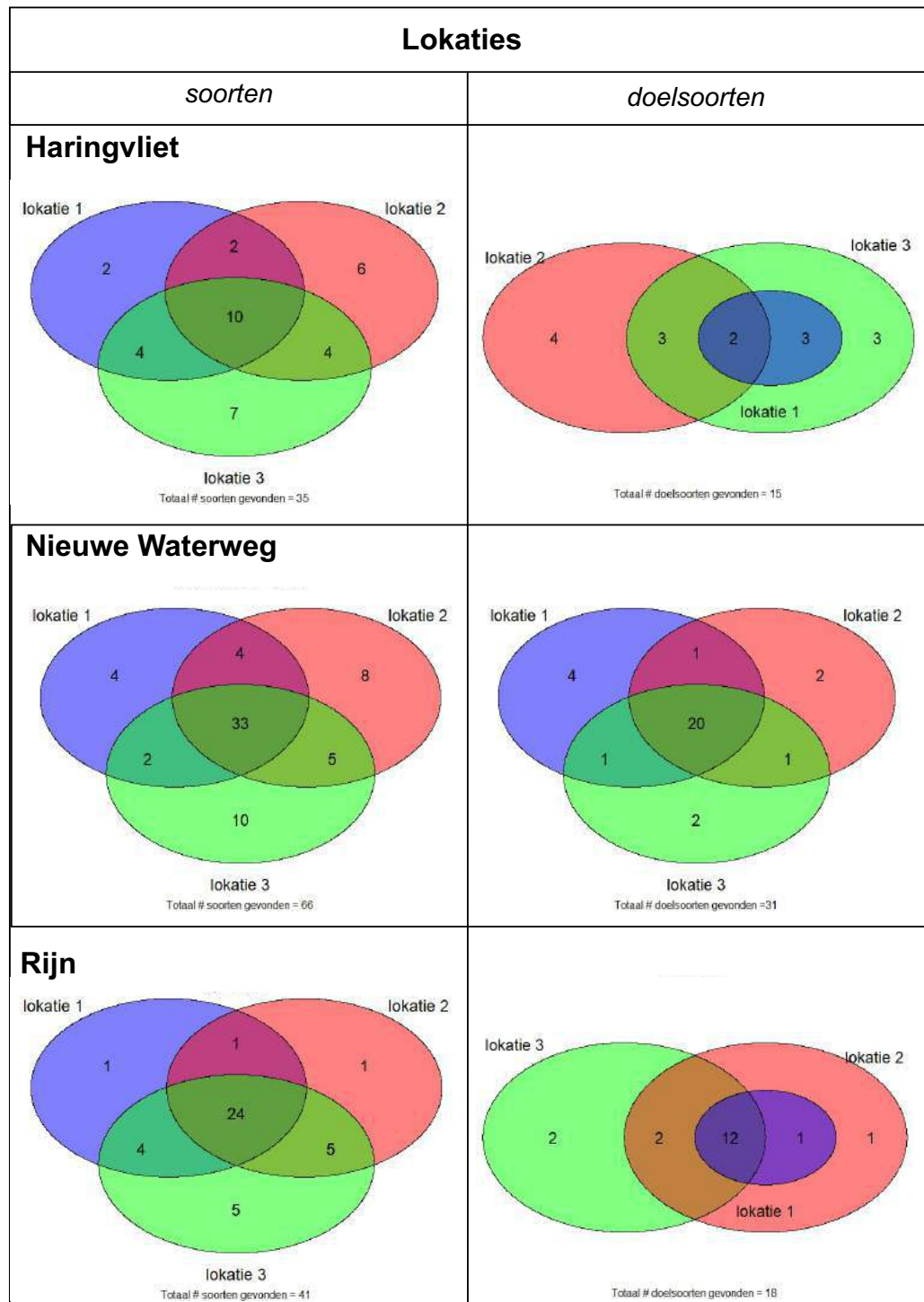
3.3.2 Variatie soortenrijkdom per locatie

Bemonsteringslocatie (locatie 1, 2 of 3; zie figuur 2.1, 2.2 en 2.3) heeft geen significant effect op de gemiddelde soortenrijkdom (i.e. het gemiddeld aantal soorten) in het Haringvliet (ANOVA: $F_{2,51}=0.23$, $p=0.8$), de Nieuwe Waterweg (ANOVA: $F_{2,51}=0.45$, $p=0.64$), en de Rijn (ANOVA: $F_{2,51}=1.35$, $p=0.27$) ($n=18$) (Figuur 3.5). Ook het gemiddeld aantal doelsoorten was niet significant verschillend tussen bemonsteringslocaties in het Haringvliet (ANOVA: $F_{2,51}=2.64$, $p=0.08$), de Nieuwe Waterweg (ANOVA: $F_{2,51}=0.53$, $p=0.59$), en de Rijn (ANOVA: $F_{2,51}=0.24$, $p=0.79$) ($n=18$).

Ook op iedere locatie afzonderlijk worden unieke soorten gedetecteerd (Figuur 3.6). Er zijn geen significante verschillen gevonden in gemiddelde soortenrijkdom. Toch kan voor alle drie de waterlichamen gesteld worden dat het totale soortbeeld (i.e. totaal aantal soorten) completer wordt als er meer dan één raai wordt bemonsterd.



Figuur 3.5: Overzicht variatie in soortenrijkdom per locatie (raai 1, 2 en 3) per waterlichaam (Haringvliet, Nieuwe Waterweg, Rijn). Per waterlichaam is onderscheid gemaakt tussen soortenrijkdom van alle soorten (donker kleur) soortenrijkdom doelsoorten (lichtere kleur). Deze figuur is samengesteld op basis van alleen 16S data welke conservatief gefilterd is.

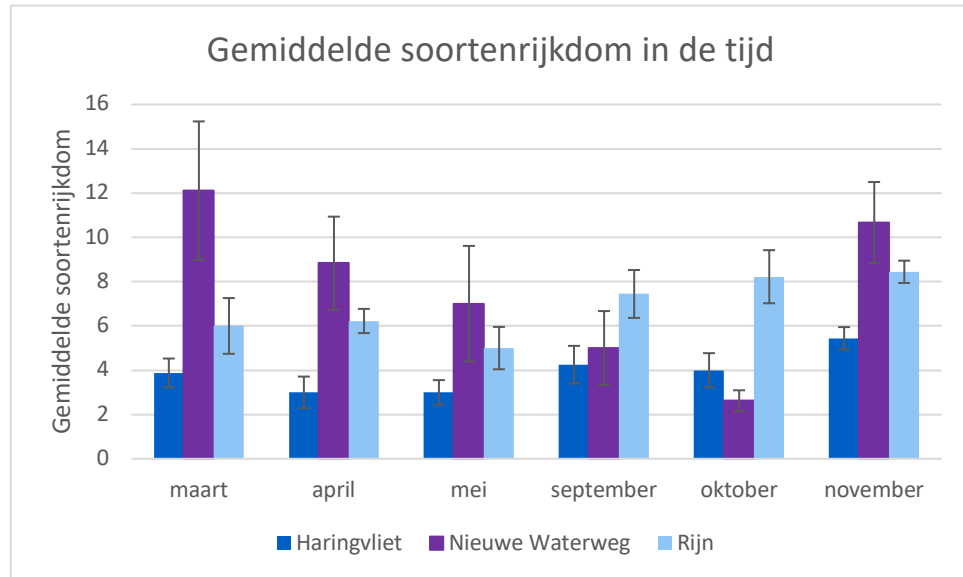


Figuur 3.6: Overzicht van overeenkomstige en unieke soorten tussen monsterlocaties (locatie 1, locatie 2, locatie 3) voor elk waterlichaam (Haringvliet, Nieuwe Waterweg, Rijn). Twee overlappende cirkels geven twee locaties aan waarbinnen dezelfde soorten zijn aangetroffen, de zone waar drie cirkels overlappen geven het aantal soorten weer dat alle drie de locaties is aangetroffen. Het linker figuur geeft het totaal aantal soorten en het rechter figuur het totaal aantal doelsoorten. Deze figuur is samengesteld op basis van uitsluitend 16S data welke conservatief gefilterd is.



3.3.3 Soortenrijkdom in de tijd

De gemiddelde soortenrijkdom per maand (n=9) is relatief constant in het Haringvliet en de Rijn, terwijl gemiddelde soortenrijkdom afneemt van maart tot oktober in de Nieuwe Waterweg. Mogelijk is dit te verklaren door het aantal migrerende vissoorten in de Nieuwe Waterweg, in maart en november vindt blijkbaar veel migratie plaats (Tabel 3.5).



Figuur 3.7: Variatie in gemiddelde soortenrijkdom per maand (n=9, gemiddelde \pm SE) voor de Haringvliet (donkerblauwe lijn), de Nieuwe Waterweg (groene lijn) en de Rijn (lichtblauwe lijn). Deze figuur is samengesteld op basis van uitsluitend 16S data welke conservatief gefilterd is.

Tabel 3.5 Voorkomen van migratievissen in de Nieuwe Waterweg, de Rijn en het Haringvliet gedurende het jaar, uitgedrukt in het aantal positieve monsters per maand (n=9). Deze tabellen zijn samengesteld op basis van uitsluitend 16S data welke conservatief gefilterd is. Alle soorten zijn ofwel gedetecteerd met 16S of tijdens de traditionele monitoring. Lege cellen geven aan dat een soort niet is gedetecteerd met 16S.

Nieuwe Waterweg							
	maart	april	mei	september	oktober	november	
Atlantische zalm	3	1					
beek-/rivierprik						1	
driedoornige stekelbaars	4	1					
elft							
fint		2	2	3			
houting - complex							
paling	6	1			2	6	
spiering	3	1				2	
zeeprik							



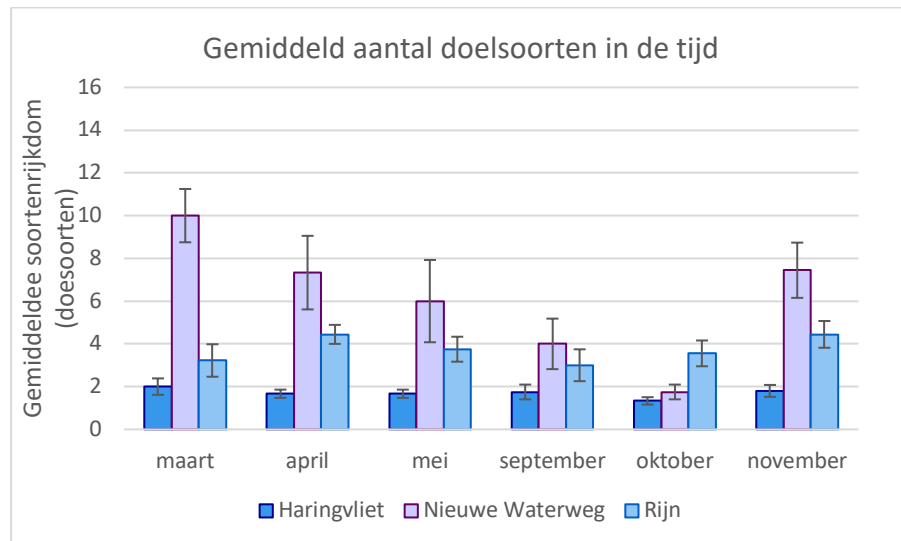
Vervolg Tabel 3.5 Voorkomen van migratievissen in de Rijn en het Haringvliet gedurende het jaar, uitgedrukt in het aantal positieve monsters per maand (n=9). Deze tabellen zijn samengesteld op basis van uitsluitend 16S data welke conservatief gefilterd is. Alle soorten zijn ofwel gedetecteerd met 16S of tijdens de traditionele monitoring. Lege cellen geven aan dat een soort niet is gedetecteerd met 16S.

Rijn						
	maart	april	mei	september	oktober	november
Atlantische zalm				4		
beek-/rivierprik	1	1			1	
driedoornige stekelbaars	1		2		1	
elft						1
houting - complex						4
paling		6	4	4	4	3
zeeprik			1			

Haringvliet						
	maart	april	mei	september	oktober	november
Atlantische zalm	1					
beek-/rivierprik	1					1
driedoornige stekelbaars		1		1	2	2
elft						
fint						
houting - complex		1		1	1	
paling	4	2	2	5	3	1
spiering	1					1
zeeprik						

3.3.4 Voorkomen van doelsoorten in de tijd

Het voorkomen van doelsoorten in de tijd (figuur 3.8) volgt hetzelfde patroon als de soortenrijkdom in de tijd (figuur 3.7): het aantal gedetecteerde doelsoorten is relatief constant in de Haringvliet en de Rijn, terwijl gemiddelde soortenrijkdom afneemt van maart tot oktober in de Nieuwe Waterweg.

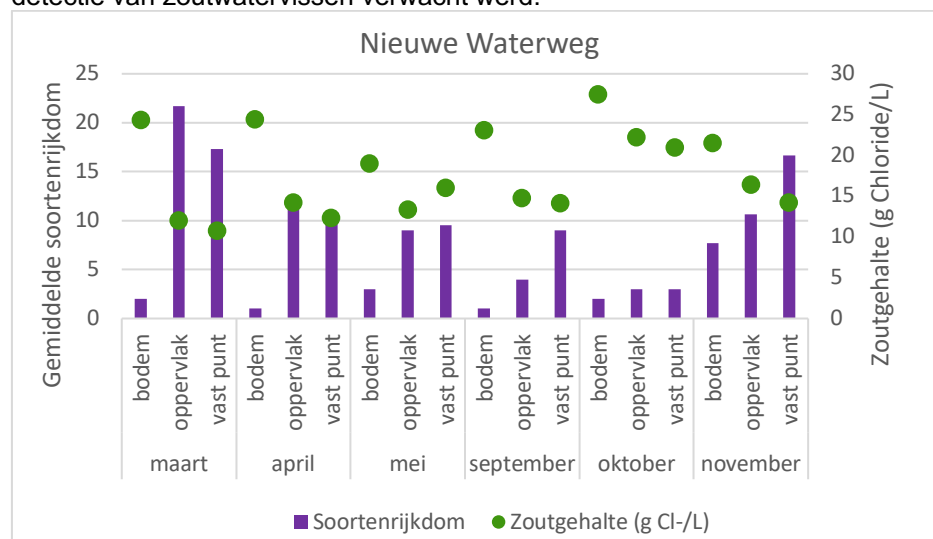


Figuur 3.8: Variatie in het gemiddelde aantal doelsoorten per maand ($n=9$, gemiddelde \pm SE) voor de Haringvliet (donkerblauwe lijn), de Nieuwe Waterweg (groene lijn) en de Rijn (lichtblauwe lijn). Deze figuur is samengesteld op basis van uitsluitend 16S data welke conservatief gefilterd is.

3.3.5 Zoutgehalte en turbiditeit in relatie tot eDNA

Effect zoutgehalte op soortenrijkdom Nieuwe Waterweg

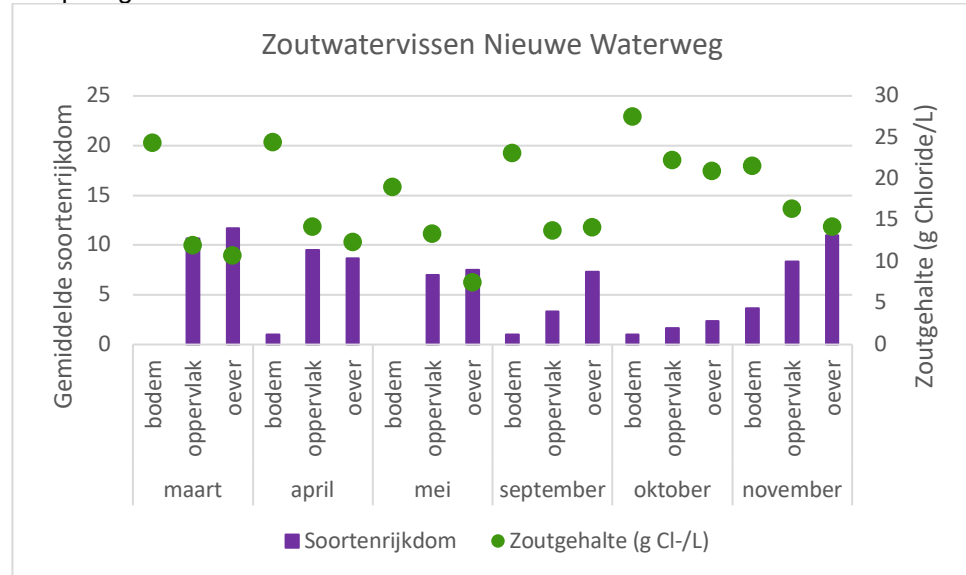
Vanwege de aanwezigheid van de zout tong is het zoutgehalte van de bodemonsters in de Nieuwe Waterweg altijd hoger (20-25 g Cl⁻/L) dan van de oppervlakte en oever monsters (10-15 g Cl⁻/L). Soortenrijkdom was consequent lager in de zoute bodemonsters (Figuur 3.9), terwijl in deze monsters juist de detectie van zoutwatervissen verwacht werd.



Figuur 3.9: Weergave tussen het zoutgehalte (g Chloride/L) en gemiddelde soortenrijkdom in eDNA monsters van de Nieuwe Waterweg, gepoold per habitat (bodem, oppervlakte, vast punt/oever) en bemonsteringsmaand ($n=3$)



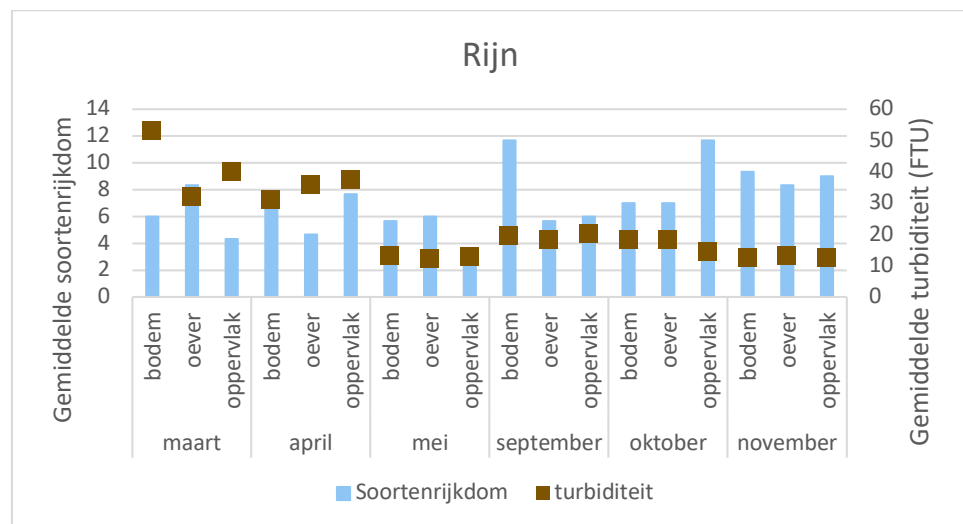
Eenzelfde figuur voor enkel zoutwatervissen in de Nieuwe Waterweg (Figuur 3.10) laat zien dat het merendeel van de zoutwatervissen juist in de oppervlakte en oever samples gedetecteerd werd.



Figuur 3.10: Weergave zoutgehalte (g Chloride/L) en gemiddelde soortenrijkdom van enkel zoutwatervissen in eDNA monsters van de Nieuwe Waterweg.

Effect turbiditeit op soortenrijkdom in Rijn en Haringvliet

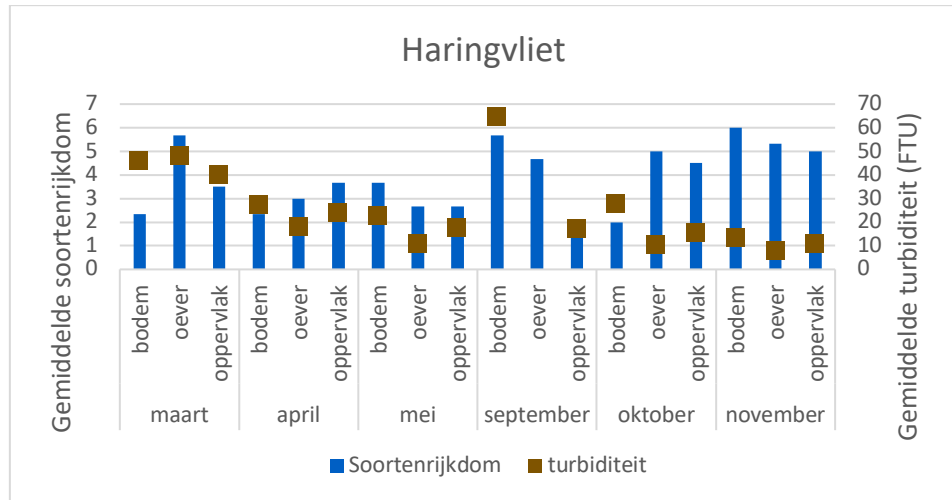
Turbiditeit van de eDNA monsters in de Rijn was hoger in de maanden maart en april (~40 FTU) vergeleken met de maanden daarna (~20 FTU). Bodemonsters hebben niet per definitie een hogere turbiditeit. Tijdens deze meetcampagne, lijkt de turbiditeit geen invloed te hebben gehad op de gemeten soortenrijkdom.



Figuur 3.11: Weergave van turbiditeit (FTU) en gemiddelde soortenrijkdom in eDNA monsters van de Rijn, gepoold per habitat (bodem, oppervlakte, vast punt/oever) en bemonsteringsmaand (maart, april, mei, september, oktober, november) (n=3).



Turbiditeit van de eDNA monsters in de Haringvliet was variabel, met onder andere hogere turbiditeit in maart (~40 FTU). Tijdens deze meetcampagne lijkt de turbiditeit geen invloed te hebben gehad op de gemeten soortenrijkdom.



Figuur 3.12: Weergave van turbiditeit (FTU) en gemiddelde soortenrijkdom in eDNA monsters van de Rijn, gepoold per habitat (bodem, oppervlak, vast punt/oever) en bemonsteringsmaand (maart, april, mei, september, oktober, november) (n=3). Door omstandigheden is er geen turbiditeit gemeten van de oevermonsters in September



4 Methodiek eDNA en betrouwbaarheid

Voor het uitvoeren van eDNA onderzoek ten aanzien van vissen in rijkswateren is vooralsnog geen standaard methodiek beschikbaar. In dit onderzoek is daarom aandacht besteed aan het effect van bemonsteringsinspanning en keuze van bemonsteringslocaties op de gedetecteerde visgemeenschap. Ook zijn een aantal monsters door twee laboratoria, Datura en KWR, geanalyseerd (duplo-analyse) om inzicht te krijgen in overeenkomsten en verschillen tussen laboratoria ten aanzien van de gegenereerde soortenlijsten.

Tenslotte bestaat er in eDNA onderzoek altijd een kans dat het waargenomen eDNA in een monster niet afkomstig is van vissen die zich daadwerkelijk op de monsterlocatie bevinden, bijv. door contaminatie of passief transport van eDNA door de rivier. Dit heeft gevolgen voor de betrouwbaarheid van de waargenomen visgemeenschap in een eDNA monster.

Dit hoofdstuk gaat in op methodische aspecten die van invloed kunnen zijn op de effectiviteit en betrouwbaarheid van eDNA als instrument om de visgemeenschap in rijkswateren in beeld te brengen.

4.1 Versturende factoren van eDNA resultaten

Bij het opsporen van eDNA bestaat de kans dat er contaminatie optreedt of er op een andere manier vervuiling van monsters optreedt. Anders geformuleerd: in de resultaten treft men eDNA aan dat niet toe te schrijven is aan het voorkomen van vissen op de locatie van monstername. Het is van belang om daarvan bewust te zijn bij de interpretatie van de gegevens en daar waar mogelijk controles in te bouwen die eventuele (systematische) bronnen in beeld brengen.

In tabel 4.1 is een overzicht gegeven van welke versturende factoren van invloed kunnen zijn op de uiteindelijke resultaten. In de hieronder volgende paragrafen worden de resultaten in relatie tot de versturende factoren verder toegelicht.



Type	Omschrijving:	Inschattin g kans:	Mechanisme:	Relevante soorten:	Beheersmaatregelen:
1.	lozingen (RWZI), schepen, recreatie zorgen voor aanvoer van gebiedsvreemd eDNA van consumptievis/aasvis	groot	er komt eDNA in zeer lage concentraties in de monsters terecht van door mensen gebruikte vissoorten die niet op de monsterplaats aanwezig zijn	consumptievis : schol, tong, paling, snolof, ansjovis, zeeforel, griet, kabeljauw, zalm, regenboogforel, haring wijting, zeebaars, etc. aasvis : spiering, zwartbekgrondel	strategisch bepalen van monsternamelocaties t.o.v. lozingspunten
2.	scheepvaart zorgt voor gebiedsvreemd eDNA uit stroomafwaartse of opwaartse wateren	groot	er komt eDNA in zeer lage concentraties in de monsters terecht terwijl de betreffende soort niet op de monsterplaats aanwezig, bijv. via ballastwater, schoonmaken van schepen, eDNA van zoutwatervissen uit de Delta kan stroomopwaarts worden vervoerd, wind - en golfslag kunnen rechtsreeks eDNA van elders in de monsters brengen	alle vissoorten uit gebieden waar de scheepvaart vaart	--
3.	waterstroming zorgt voor aanvoer van gebiedsvreemd eDNA uit bovenstroomse wateren	groot	er komt eDNA in zeer lage concentraties in de monsters terecht terwijl de betreffende soort niet op de monsterplaats aanwezig is maar alleen stroomopwaarts	alle vissoorten uit bovenstroomse wateren	goed inrichten monsternamelocaties
4.	veldwerkers en -materialen brengen gebiedsvreemd eDNA in het monster	matig	ondanks protocollen voor steriel werken is besmetting mogelijk via deeltjes op kleding, apparatuur en de veldboot die wordt gebruikt (via wind, golfslag)	alle vissoorten uit gebieden waar het veldteam werkt en waar de onderzoeksmaterialen worden gebruikt	Chloor ontsmetting, schone kleding en materialen, steriel sample materiaal, uitvoeren veldcontroles
5.	eDNA besmetting in het laboratorium	klein	besmetting via aerosolen uit andere eDNA samples is theoretisch mogelijk	alle vissoorten waar in het DNA lab mee wordt gewerkt	uitvoeren van negatieve controles voor extractie en PCR stappen in het lab
6.	PCR/sequentiefouten in het laboratorium	zeer klein	tijdens de PCR- en sequencestappen bestaat een kleine kans op biochemische DNA kopieerfouten, deze zijn inherent aan de methode en niet door mensen te beïnvloeden	mogelijk bij vissoorten waarvan de onderscheidende sequenties phylogenetisch sterk op elkaar lijken, bijv. platvissen en karperachtigen	vrijwel alle PCR- en sequentiefouten worden eruit gehaald in de Obitoools pipeline, meeste PCR- en sequentiefouten komen in beperkt aantal reads voor (<10 reads)
7.	crossing-over van monster tags in het laboratorium	zeer klein	monsters worden biochemisch gelabeld, hierbij kunnen biochemische fouten ontstaan waardoor DNA reads aan verkeerde monsters worden toegeschreven, deze zijn inherent aan de methode en niet door mensen te beïnvloeden	alle gedetecteerde soorten	vrijwel alle fouten worden eruit gehaald in de Obitoools pipeline

Tabel 4.1. Overzicht en omschrijving van verschillende types misinterpretaties die in eDNA detectie kunnen optreden geordend op mate van importantie.



Externe bronnen van eDNA

Met het gebruik van eDNA worden idealiter alleen vissoorten aangetoond die daadwerkelijk in een waterpartij aanwezig zijn. De realiteit is dat DNA ook verspreid kan worden door andere bronnen en het is niet uit te sluiten dat DNA over grote afstanden kan migreren. In geval van DNA dat voor kan komen op rivieren zijn diverse bronnen te identificeren zoals gemalen die afwateren op de rivier, water uit het achterland en inkomende beken en rivieren, rioolwaterzuiveringsinstallaties, lozingen van ballastwater of (visverwerkende)-bedrijven.

Bovendien kunnen in stromende wateren ook DNA sporen opgepikt worden van (vis)soorten die mogelijk kilometers bovenstrooms voorkomen maar niet in het waterlichaam van onderzoek. Dit kan resulteren in een soortenlijst die niet volledig representatief zal zijn voor de locatie van onderzoek. Zo zal het onwaarschijnlijk zijn dat (populaties van) beekdonderpad of gestippelde alver voorkomen in de Rijn bij Lobith. Er zijn ook soorten aangetroffen die mogelijk wel op locatie voor kunnen komen, maar niet of zeer sporadisch gevangen zijn. Ook het voorkomen van dergelijke soorten moet met kennis van zaken geïnterpreteerd worden. Voorbeelden zijn gestippelde alver, elft, beekdonderpad. Dit zijn soorten die met een laag aantal reads worden aangetroffen in bijvoorbeeld in een beperkt deel van de Rijn monsters.



Een voorbeeld van een potentiële externe DNA bron; tijdens een vismonitoring ter hoogte van Tiel in de Waal in juli 2019 is een vol, maar niet intact, blikje Sardines aangetroffen in de zegen (foto N. van Kessel).

Contaminatie in het veld en/of het laboratorium

Het voorkomen van eDNA kan ook bepaald worden door actieve inbreng van monsternemers (veldmedewerkers) of gebruikte apparatuur. In theorie kan eDNA via handen, kleding, boten of andere monsternamen apparatuur het monster



verstoren. In deze pilot is nagestreefd om DNA zo snel als mogelijk te fixeren, dus is er op de boot al gefiltreerd, waarna het filtratie membraan is gefixeerd in CTAB-buffer. Naast de contaminatie in het veld is contaminatie in het laboratorium ook een manier om uitwisseling tussen monsters plaats te laten vinden. Dit kan al tijdens DNA-extractie of bij het inzetten van PCR-analyse plaatsvinden.

Voor de diverse manieren van contaminatie zijn in dit onderzoek enkele controlestappen geïntroduceerd. Zo zijn er in het veld (negatieve) controle monsters verzameld waarbij DNA-vrij water gefilterd is. Deze veldcontroles hebben verder de hele procedure van DNA-analyse doorlopen.

Uit onderstaande tabel (Tabel 4.2) blijkt dat in de diverse monsters vier soorten aangetroffen zijn in de veldcontroles. Een positieve veldcontrole betekent dat er ondanks alle voorzorgsmaatregelen toch contaminatie heeft plaatsgevonden tijdens filtratie in het veld. Het zijn alle vier vissoorten die ook in de veldmonsters aangetroffen zijn.

Tabel 4.2 Overzicht van vissoorten die zijn gedetecteerd in de eDNA monsters en veldcontroles van elk waterlichaam.

	Haringvliet		Nieuwe Waterweg		Rijn	
	monster	veld controle	monster	veld controle	monster	veld controle
soorten						
karper	+	+	+		+	+
kleine modderkruiper	+	+	+	+	+	+
winde	+		+	+	+	
Ammodytes sp.	+	+	+			

In het laboratorium is ook de kans op contaminatie tussen monsters aanwezig. In het proces worden allerhande voorzorgsmaatregelen genomen (zie ook hoofdstuk 2). Desondanks is contaminatie niet volledig uit te sluiten. Om die reden worden ook in het laboratorium actief blanco extracties toegevoegd aan het proces. Dergelijke extractie blanco's doorlopen het gehele proces van DNA-extractie tot sequentieanalyse. In theorie zou in deze samples geen vissen DNA materiaal aangetoond kunnen worden.

Uit Tabel 4.3 blijkt dat ook in deze labcontroles een enkele contaminatie wordt gedetecteerd. Kleine modderkruiper werd ook in twee veldcontroles waargenomen. Dit is mogelijk veroorzaakt doordat in 2015 museummonsters van kleine modderkruiper zijn onderzocht in dit laboratorium. Hieruit blijkt dat zelfs lage DNA-concentratie van museumexemplaren (ancient DNA) een tot vervuiling van eDNA monsters kunnen leiden. Eén soort (Europese sardien) is niet gedetecteerd in de overige veldmonsters en dit betreft mogelijk een besmetting in het lab ten tijde van de lab analyse, of een vervuiling van de als 'steriel' aangekochte materialen die gebruikt zijn bij het verwerken van de samples.



Tabel 4.3 Overzicht van soorten die zijn gedetecteerd op basis van 16S in de extractie en/of PCR controle in het eDNA laboratorium.

	laboratorium	
	extractie controle	PCR controle
soorten		
Europese sardien		+
karper		+
kleine modderkruiper	+	+

PCR/sequentiefouten

Bij iedere PCR-reactie is de kans op introductie van oneigenlijke producten aanwezig. Theoretisch kunnen dergelijke producten een behoorlijke hoeveelheid DNA-producten opleveren die niet matchen met de doelorganismen, in dit geval vissen. De kans dat dergelijke producten wel matchen met vissoorten die aanvankelijk niet aanwezig waren in het startmateriaal is aanwezig maar deze kans is zeer klein. Waarschijnlijker is dat dergelijke producten na sequentie analyse niet matchen met de referentiedatabase en gerapporteerd worden als “*unidentified*”. Na PCR-amplificatie worden de producten altijd gecontroleerd op mate van opbrengst en op lengte (hoeveelheid baseparen). Wanneer dit afwijkt van de te verwachten lengtes wordt een PCR-reactie herhaald.

Ook binnen het sequencing proces is de kans aanwezig dat stukjes DNA niet goed afgelezen worden met als resultaat dat er sequenties ontstaan die niet van origine in het PCR-materiaal aanwezig waren. Ook hiervoor geldt dat ontstane “spook”-sequenties nagenoeg niet zullen matchen met vis DNA-sequenties zoals die opgenomen zijn in de DNA-database van vissen. Ook hiervoor geldt dat de kans (veel) groter is dat sequenties uiteindelijk gerapporteerd zullen worden als “*unidentified*”.

Het voorkomen van bovenstaande introducties van foute sequenties is nagenoeg niet te realiseren en inherent aan de methodiek. Mochten als gevolg van dergelijke introducties van foute sequenties toch vissoorten naar voren komen die oorspronkelijk niet aanwezig waren in het startmateriaal, dan is het beoordelen door de gebruiker van dergelijke uitkomsten cruciaal.

Waarschijnlijkheid van voorkomen vissoorten

Op basis van eDNA metabarcoding worden soortlijsten gegenereerd van soorten waarvan (e)DNA wordt aangetroffen in het watersysteem. De oorsprong van het DNA is niet per definitie duidelijk. Op basis van bestaande kennis en expert-judgement is een inschatting gemaakt of soorten die op basis van eDNA zijn gedetecteerd ook daadwerkelijk fysiek aanwezig kunnen zijn op de betreffende locaties. In Tabel 4.4 wordt de situatie voor de Rijn weergegeven, de tabellen met situaties voor de overige waterlichamen zijn opgenomen bijlage V. Alleen soorten worden behandeld waarvan een discrepantie in aanwezigheid is geconstateerd tussen 16S detectie en traditionele vangmethodieken.



Tabel 4.4. Discrepantie in aangetroffen soorten middels eDNA (16S in 2018) en traditionele vangmethodieken (actief-passief in periode 2012-2016) in de Rijn. Er wordt een toelichting op de waarschijnlijkheid van aanwezigheid in 2018 gegeven.

Rijn			
Vissoorten	16S	actief-passief	Toelichting
Atlantische zalm	+	+	De soort wordt veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft
Ansjovis	+	-	De soort wordt gegeten. Onduidelijk is wat de exacte oorsprong (vervuilingsbron) is van het eDNA.
Beekdonderpad	+	-	Soort van stromende beken en rivieren stroomopwaarts van de Nederlandse Rijn. Mogelijk hooguit sporadisch aanwezig
Elft	+	-	Soort is zeer zeldzaam, maar wordt bovenstrooms van de Nederlandse rijn geherintroduceerd en migreert over lange afstanden stroomop- en afwaarts.
Elrits	+	-	Soort van stromende beken en rivieren stroomopwaarts van de Nederlandse Rijn. Mogelijk hooguit sporadisch aanwezig
Gestippelde alver	+	-	Soort van stromende beken en rivieren stroomopwaarts van de Nederlandse Rijn. Een exemplaar is recent wel in de Nederlandse Rijn aangetroffen. Aanwezigheid hooguit sporadisch.
Haring	+	-	De soort wordt veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft
Regenboogforel	+	-	De soort wordt veel uitgezet voor de sportvisserij (forellenvijvers). Daarnaast wordt de soort veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft.
Rivierdonderpad	+	-	De soort is altijd zeldzaam geweest in de Rijn. De opkomst van Ponto-Kaspische grondels heeft de soort in andere delen van Nederland al doen verdwijnen.
Witvinriviergrondel	+	-	Op basis van visgegevens uit onderzoeken in 2018 en 2019 stroomafwaarts van het waterlichaam, kan gesteld worden dat het zeer aannemelijk is dat witvinriviergrondel in de Rijn aanwezig is.
Zeeprik	+	-	Soort gebruikt de Rijn als doortrek route van en naar zee gedurende bepaalde perioden van het jaar.
Rietvoorn	-	+	Algemene zoetwatervissoort.
Snoek	-	+	Algemene zoetwatervissoort.

4.2 Validatie van de methodiek

Mock community

In de mock communities zoals samengesteld door KWR (bestaande uit 267,077 DNA copies) zijn 19 van de 28 vissoorten gedetecteerd gebruik makend van de lab en bio-informatica technieken van Datura Molecular Solutions voor 16S ("conservatieve filtering"). In principe wordt een gelijke detectie van vissoorten verwacht in alle replica mocks. Echter, van de 19 gedetecteerde soorten was de detectiekans (het percentage mock samples met positieve detectie) niet altijd 100%, maar lag tussen de 17 en 83%. Bijvoorbeeld, de Europese meerval is maar in 1 van de 6 replica's gedetecteerd (17%). Daarentegen werd bijvoorbeeld haring in alle 6 replica's gedetecteerd (100%). Voornamelijk de resultaten van mock 3 waren inconsequent met de resultaten van de overige mocks (Tabel 4.5a). Oorzaak hiervan is dat de door de conservatieve instelling van de bio-informatica pipeline is een deel van de reads onterecht als vals-positief wordt beschouwd. Een aanpassing van de instellingen van de Python pipeline (minder conservatief) en het gebruik van de combinatie van 12S en 16S primers leidt tot een meer consequente detectie van alle soorten in de mock community (tabel 4.5b). Dit duidt



erop dat de huidige instellingen van de bio-informatica te conservatief zijn en daardoor onterecht detecties verwijderd zijn uit de dataset. In bijlage I is uiteengezet wat het verschil in data-filtering inhoud.

Bot en schol zijn zowel op basis van 12S en 16S niet te onderscheiden. De detecties van bot zijn als gevolg daarvan opgenomen onder “overig” als bot/schol. Het onderscheid tussen baars en snoekbaars kan alleen gemaakt worden op basis van 16S. In de monsters waarin baars/snoekbaars alleen met de 12S primers gedetecteerd werden kon als gevolg daarvan niet vastgesteld worden of het DNA afkomstig was van baars of van snoekbaars. Deze detecties zijn opgenomen onder “overig”. Rode poot is niet gedetecteerd. Uit nader onderzoek bleek dat er wel DNA aanwezig is van een onbekende pootsoort. Omdat deze soort niet aanwezig is in de referentie database van Datura werd deze poot niet door de pipeline geïdentificeerd. Tenslotte werd regenboogforel gedetecteerd. Mogelijk is door de progressieve filtering het onderscheid tussen enkele verwante soorten deels kwijt is geraakt: Regenboogforel verschilt slechts 1 nucleotide van Zalm en 5 nucleotiden van Beekforel. Daarnaast is niet 100% uit te sluiten dat de mock community vervuild is geraakt met regenboogforel als gevolg van het feit dat de mock community deels is samengesteld op basis van vis die bij een vishandel verkregen is.



Tabel 4.5a: Overzicht van de vissoorten in de mock communities van KWR (mock zoet en mock zout), het percentage DNA copies per vissoort en het percentage 16S reads (t.o.v. total 16S fish reads) op basis van de conservatieve filtering waarmee de vissoort is gedetecteerd in elk van de 6 replica mocks. Tenslotte wordt de kans gegeven op detectie van het DNA van een vissoort in een mock-sample (met de toegepaste lab en bio-informatica technieken). De met asteriks (*) gelabelde soorten waren door KWR gelabeld als kleine modderkruiper, grauwe poon en schar.

" conservatieve filtering"								
		Mock1	Mock2	Mock3	Mock4	Mock5	Mock6	detectie kans
KWR mock zoet	DNA copies							
baars	3.2%							
bermpje	0.1%							
blankvoorn	3.0%							
driedoornige stekelbaars	2.6%		3.4%		3.4%	3.3%	3.4%	67%
Europese meerval	3.4%				0.1%			17%
karper	2.9%	0.3%	5.4%		5.2%	6.4%	4.7%	83%
kesslers grondel	2.8%							
kleine modderkruiper – hybride*	2.8%	1.0%	0.9%	1.4%	0.7%	0.9%	0.7%	100%
kwabaal	0.6%			0.05%	0.02%	0.04%	0.03%	67%
Pontische stroomgrondel	3.4%		6.6%		4.9%	5.7%	5.4%	67%
snoekbaars	2.8%							
spiering	1.0%	1.1%	1.1%	1.1%	0.9%	0.9%	0.7%	100%
zonnebaars	4.9%	9.8%	8.7%	10.5%	7.7%	8.2%	8.0%	100%
Atlantische horsmakreel	3.2%	6.7%	5.6%	7.3%	5.5%	6.0%	5.3%	100%
KWR mock zout								
beek/zeeforel	3.2%	0.1%	2.0%	0.1%	4.2%	1.5%	3.1%	100%
bot	4.1%							
Engelse/grauwe poon*	3.9%	8.4%	5.7%	7.9%	5.1%	5.4%	6.2%	100%
Europese zeebaars	4.9%	8.1%	5.8%	5.9%	6.9%	4.6%	9.2%	100%
haring	3.7%	15.3%	11.2%	12.7%	10.9%	12.1%	9.4%	100%
kroeskarper	3.8%	3.8%	3.6%	5.5%	3.2%	4.1%	2.8%	100%
lange schar/schar*	2.9%	13.6%	10.5%	13.1%	10.6%	11.2%	10.1%	100%
rode poon	3.5%							
tarbot	4.1%	8.4%	7.0%	8.1%	6.5%	7.1%	7.2%	100%
tong	4.3%							
tongschar	6.2%	11.3%	8.7%	11.2%	8.9%	9.7%	8.4%	100%
wijting	4.6%		4.5%	6.0%	4.6%	4.9%	4.8%	83%
KWR mock zoet + zout								
snoek	6.4%							
Atlantische zalm	7.6%	12.0%	9.1%	9.2%	10.7%	7.8%	10.7%	100%



Tabel 4.5b: Overzicht van de vissoorten in de mock communities van KWR (mock zoet en mock zout) op basis van de combinatie van 12S en 16S reads en de toepassing van **progressieve filtering**. Weergegeven is het percentage DNA copies per vissoort en de gemiddelde frequentie van 12S en 16S reads waarmee de vissoort is gedetecteerd in elk van de 6 replica mocks en de kans op detectie van het DNA van een vissoort in een mock-sample (met de toegepaste lab en bio-informatica technieken). De met asteriks (*) gelabelde soorten waren door KWR gelabeld als kleine modderkruiper, grauwe poon en schar. Onder “overig” staan vissoorten die niet in de mock communities zaten maar waarvan wel DNA-sequenties zijn gedetecteerd.

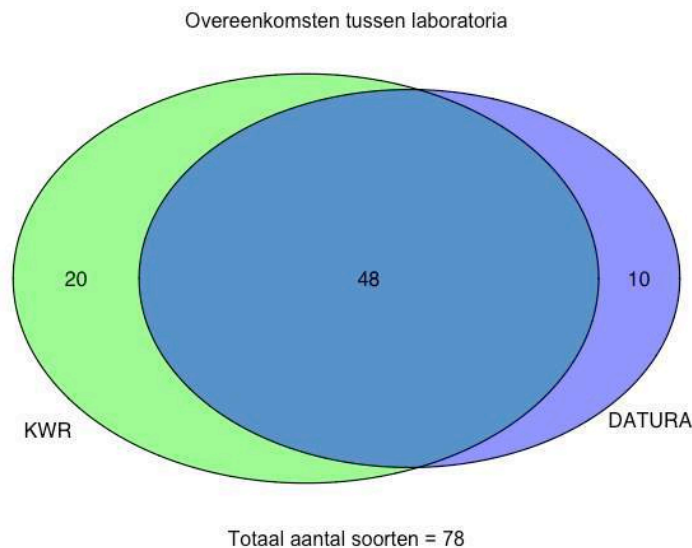
“progressieve filtering”								
		Mock1	Mock2	Mock3	Mock4	Mock5	Mock6	detectie kans
KWR mock zoet	DNA copies							
Baars	3.2%		3%		2%	2%	4%	67%
Bermpje	0.1%	0.04%	0.03%	0.03%	0.04%	0.03%	0.03%	100%
Blankvoorn	3.0%	2%	3%	0.1%	4%	4%	3%	100%
Driedoornige stekelbaars	2.6%	1%	2%	1%	1%	1%	1%	100%
Europese meerval	3.4%	3%	2%	4%	3%	2%	2%	100%
Karper	2.9%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	100%
Kesslers grondel	2.8%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	100%
Kleine modderkruiper – hybride*	2.8%	2%	1%	2%	1%	1%	1%	100%
Kwabaal	0.6%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	100%
Pontische stroomgrondel	3.4%	5%	5%	5%	4%	4%	4%	100%
Snoekbaars	2.8%		3%		2%	2%	3%	67%
Spiering	1.0%	0.4%	0.6%	0.4%	0.4%	0.5%	0.4%	100%
Zonnebaars	4.9%	6%	6%	6%	5%	5%	5%	100%
Atlantische horsmakreel	3.2%	1%	2%	2%	1%	2%	2%	100%
KWR mock zout								
Beek/zeeforel	3.2%	2%	2%	2%	3%	2%	2%	100%
Bot	4.1%							
Engelse/grauwe poon*	3.9%	11%	8%	12%	10%	7%	9%	100%
Europese zeebaars	4.9%	5%	4%	4%	4%	3%	5%	100%
Haring	3.7%	6%	9%	6%	6%	9%	7%	100%
Kroeskarper	3.8%	4%	3%	3%	3%	3%	3%	100%
Lange schar/schar*	2.9%	4%	8%	5%	5%	7%	6%	100%
Rode poon	3.5%							
Tarbot	4.1%	1%	3%	2%	2%	3%	2%	100%
Tong	4.3%	3%	3%	3%	3%	3%	2%	100%
Tongschar	6.2%	3%	7%	5%	4%	6%	5%	100%
Wijting	4.6%	9%	8%	10%	8%	8%	8%	100%
KWR mock zoet + zout								
Snoek	6.4%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	100%
Atlantische zalm	7.6%	7%	7%	6%	6%	6%	7%	100%
Overig								
Bot/schol		4%	3%	3%	3%	3%	2%	100%
Baars/snoekbaars		11%	0%	11%	9%	6%	8%	100%
Regenboogforel		0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	100%



4.3 Verschillen tussen laboratoria

Verschillen tussen duplomonsters

In totaal werden 36 monsters, waaronder 6 veldcontroles (één controle in het voorjaar en één in het najaar van elk waterlichaam) en 30 eDNA monsters (10 eDNA monsters per waterlichaam, waaronder 2-4 per habitat), geanalyseerd door beide laboratoria: Datura Molecular Solutions en KWR. In totaal werden er 78 soorten aangetroffen, waarvan 48 overlappende soorten en 20 soorten uniek voor KWR en 10 soorten uniek voor Datura Molecular Solutions (Figuur 4.1). In Bijlage III zijn de soortenlijsten op basis van de 30 duplo monsters opgenomen met een overzicht van de overlappende en unieke soortendetectie. In Bijlage IV is een lijst opgenomen waarin de resultaten van de in deze rapportage gebruikte instellingen van Python pipeline (minimaal 50 reads, $X=1$ en laatste threshold = 0,0008) worden vergeleken met minder conservatieve, “progressieve” instellingen (minimaal 50 reads, 16SX=30, 12SX=25 en laatste threshold = 0,00015). In bijlage VI is een voorbeeld van een monster opgenomen waaruit inzichtelijk wordt wat het effect is van de toegepaste filterstappen.

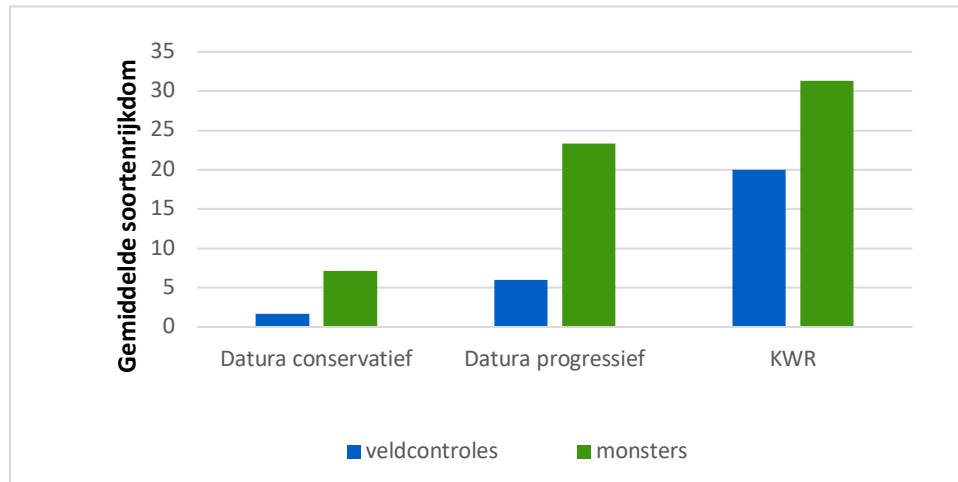


Figuur 4.1: Overzicht van overeenkomstige en unieke soorten aangetroffen in de verschillende laboratoria (KWR: groene cirkel, Datura Molecular Solutions: paarse cirkel) voor alle duplo eDNA monsters. De overlapping tussen twee cirkels geeft aan hoeveel soorten door beide laboratoria zijn aangetroffen.

Ondanks de verschillen in de gebruikte primer sets tussen laboratoria, was de gedetecteerde soortensamenstelling voornamelijk overlappend (62%). De gemiddelde soortenrijkdom aangetroffen in de eDNA monsters door KWR was hoger dan door Datura Molecular Solutions. Het gemiddelde aantal soorten in de veldcontroles was hoger bij KWR dan bij Datura Molecular Solutions (Figuur 4.2). Hierdoor kan er alleen geconstateerd worden dat er verschillen zijn in de werkwijze tussen de laboratoria, in de laboratorium fase of in de bio-informatica fase. Een



degelijke vergelijking tussen de laboratoria is niet mogelijk zonder details over de gebruikte bio-informatica.



Figuur 4.2: Gemiddelde soortenrijkdom aangetroffen in duplomonsters geanalyseerd door Datura Molecular Solutions (zowel met conservatieve en progressieve instellingen van de python pipeline) en KWR. Onderscheid is gemaakt tussen eDNA monsters en veldcontroles.



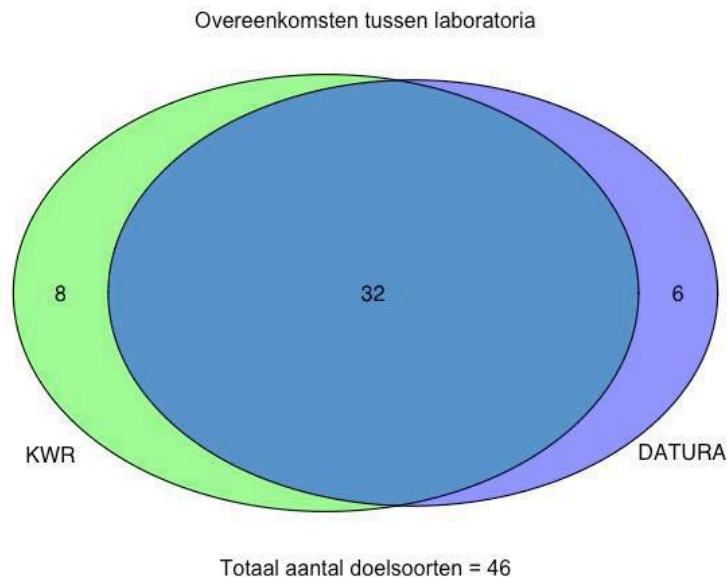
Tabel 4.4: Vissoorten gedetecteerd in de veldcontroles door Datura Molecular Solutions en KWR.

	DATURA						KWR					
	maart			september			maart			september		
	Haringvliet	Nieuwe Waterweg	Rijn	Haringvliet	Nieuwe Waterweg	Rijn	Haringvliet	Nieuwe Waterweg	Rijn	Haringvliet	Nieuwe Waterweg	Rijn
Atlantische zalm												
baars												
barbeel												
beek/zeeforel												
blankvoorn												
brasem												
driedoornige stekelbaars												
Europese meerval												
karper												
Kesslers grondel												
kleine modderkruiper												
kwabaal												
paling												
Pontische stroomgrondel												
pos												
roofblei												
schol												
snoek												
snoekbaars												
spiering												
winde												
witvingrondel												
zonnebaars												
zwartbekgrondel												



Aanwezigheid van doelsoorten

In totaal werden er 46 doelsoorten gedetecteerd in de 30 duplo monsters, waarvan 32 overlappende doelsoorten, 8 doelsoorten uniek voor KWR en 6 doelsoorten uniek voor Datura Molecular Solutions indien uitsluitend gebruikt gemaakt werd van 16S data welke conservatief gefilterd werd (Figuur 4.3, Bijlage III). Zie Bijlage IV voor de resultaten van de progressieve filtering.



Figuur 4.3: Overzicht van overeenkomstige en unieke doelsoorten aangetroffen in de verschillende laboratoria (KWR: groene cirkel, DATURA conservatief gefilterd: paarse cirkel) voor alle duplo eDNA monsters. De overlapping tussen twee cirkels geeft aan hoeveel soorten door beide laboratoria zijn aangetroffen.

Referentie database

De referentie database van Datura Molecular Solutions bevat 234 soorten, waaronder alle 66 doelsoorten, en 5 taxa die niet op soortnaam gebracht kunnen worden. De referentiedatabase van KWR bevat 108 soorten, waarvan 61 van de 66 doelsoorten en 1 taxa die niet op soortnaam gebracht kunnen worden (Bijlage II). Slechts 1 van de 5 doelsoorten die niet in de database van KWR staan werd aangetroffen tijdens deze studie: de vorskwab in de Nieuwe Waterweg.

Een aantal (doel)soorten is slechts gedetecteerd door één van de twee laboratoria, terwijl de soort zich in beide referentiedatabases bevindt. Dit suggereert het belang van primer combinaties, het lab proces en de bio informatica pijplijn. Voorbeeld, de vissoorten beekdonderpad en fint zijn alleen door Datura Molecular Solutions gedetecteerd, en de vissoorten elft en kwabaal zijn alleen door KWR gedetecteerd terwijl de soorten in beide referentiedatabases zitten (vergelijk Bijlage II en III). De vissoort bot zit in beide referentie databases, maar kan niet tot soortnaam worden gedetecteerd met 16S van Datura Molecular Solutions.



4.4 Bemonsteringsinspanning

Soortenverzadigingscurves en geschatte soortenrijkdom

Op basis van eDNA metabarcoding is een groot aantal soorten in het onderzoek aangetroffen. Een van de vragen die van belang is, is hoeveel monsters nu nodig zijn om een representatieve inschatting van de aanwezigheid van doelsoorten te verkrijgen. Om deze vraag te beantwoorden zijn op basis van de detailbemonstering in mei en oktober soortverzadigingscurves opgesteld voor **doelsoorten** in de drie waterlichamen (Figuur 4.4).

Een soortenverzadigingscurve geeft aan hoe het aantal soorten toeneemt met het aantal monsters. Als er voldoende monsters zijn verzameld worden geen nieuwe soorten meer aangetroffen en gaat de curve vlak lopen. Daarnaast is met behulp van de *jackknife* procedure (Efron and Tibshirani 1993) het totaal aantal theoretische doelsoorten geschat op basis van de variatie in het werkelijke aantal soorten in de monsters uit de detailmeting. Dit geschatte aantal soorten is een theoretisch getal, het geeft aan in hoeverre het aantal monsters toereikend is voor het in beeld brengen van de soortengemeenschap. Idealiter is het theoretisch geschatte aantal soorten gelijk aan het werkelijk aantal waargenomen soorten. Als de waarden echter sterk van elkaar verschillen is het aantal monsters onvoldoende om de totale soortenrijkdom in te schatten. De relatie tussen het werkelijk aantal aangetroffen soorten en het geschatte aantal soorten staat weergegeven in Figuur 4.5.

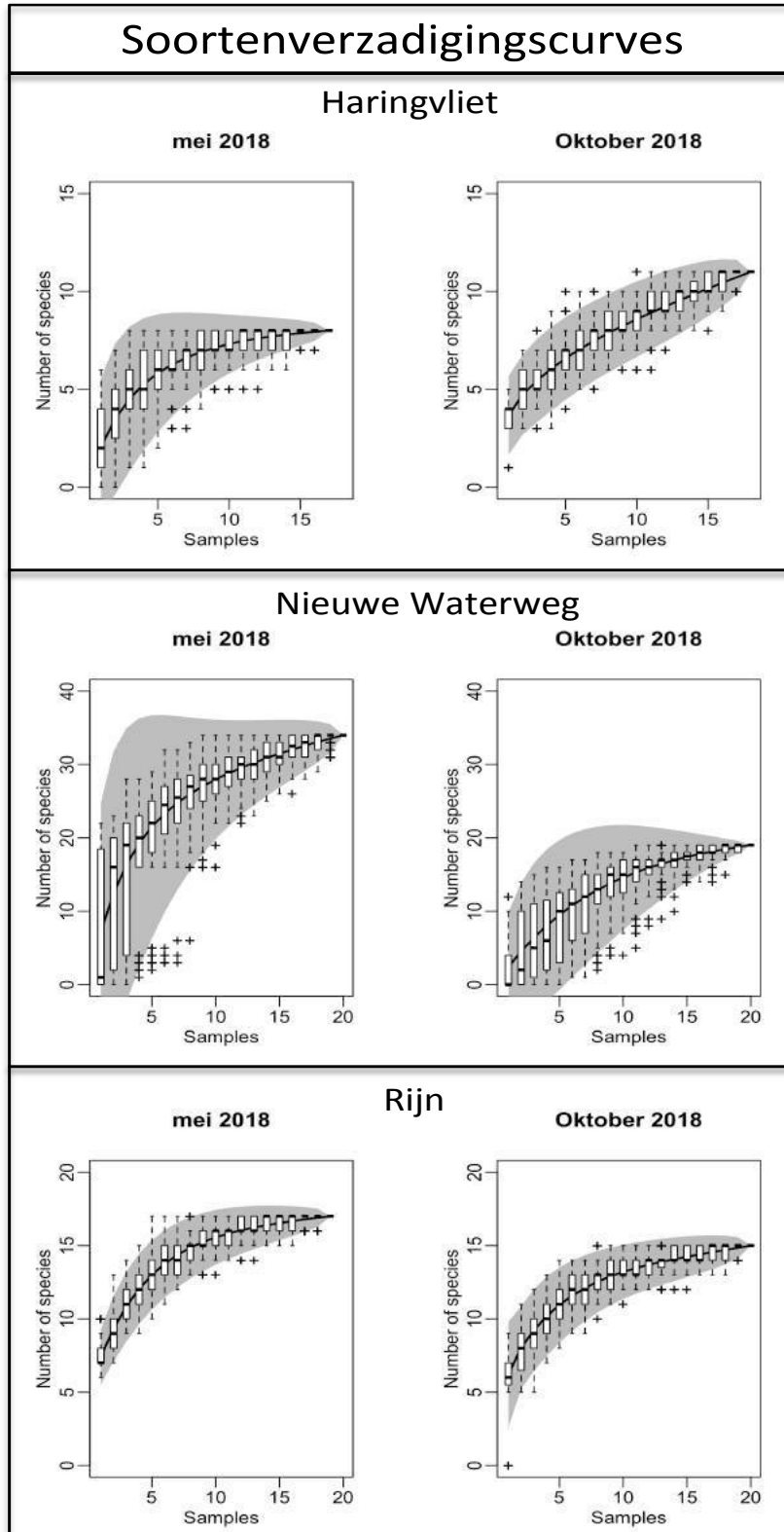
Aantal benodigde monsters

De soortenverzadigingscurves en soortenrijkdom schattingen van doelsoorten geven enerzijds aan dat er situaties zijn dat met de 20 monsters uit de detailmeting in een waterlichaam voldoende inspanning is geleverd om een representatief beeld van het voorkomen van doelsoorten te geven. In de Haringvliet in mei en in de Rijn in oktober is zichtbaar dat de soortenverzadigingscurves vlak gaan lopen vanaf ca. 16 monsters (Figuur 4.4), maar dat het geschatte aantal soorten niet ver van het werkelijk aantal aangetroffen soorten ligt (Figuur 4.5). In deze situaties kan gesteld worden dat de bemonsteringsinspanning voldoende is geweest om het voorkomen van soorten aan te tonen, meer monsters geven nauwelijks beter resultaat. Dit aantal ligt overigens nog ver boven het aantal van negen mengmonsters dat nu tijdens elke bemonsteringsronde per waterlichaam zijn verzameld. Tijdens de bemonstering van de Haringvliet en de Rijn in mei gaf het werkelijk aangetroffen aantal soorten (op basis van negen mengmonsters) wel een overeenkomstig beeld met het geschatte aantal soorten.

Anderzijds zijn er ook situaties dat het aantal monsters onvoldoende is om een representatief beeld van het voorkomen van doelsoorten weer te geven. In deze gevallen lopen de soortenverzadigingscurves nog niet vlak en ligt het aantal geschatte soorten aanzienlijk hoger dan het werkelijk aantal waargenomen soorten. Een hogere bemonsteringsinspanning dan de 20 individuele monsters zou in deze gevallen een verbetering van de trefkans van soorten geven. Op basis van

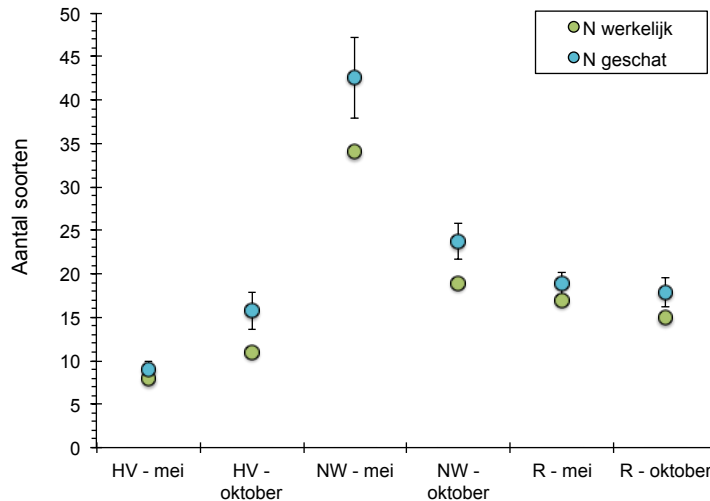


de detailmetingen is het aantal van 16 monsters de ondergrens om een betrouwbaar beeld van het voorkomen van doelsoorten te geven.





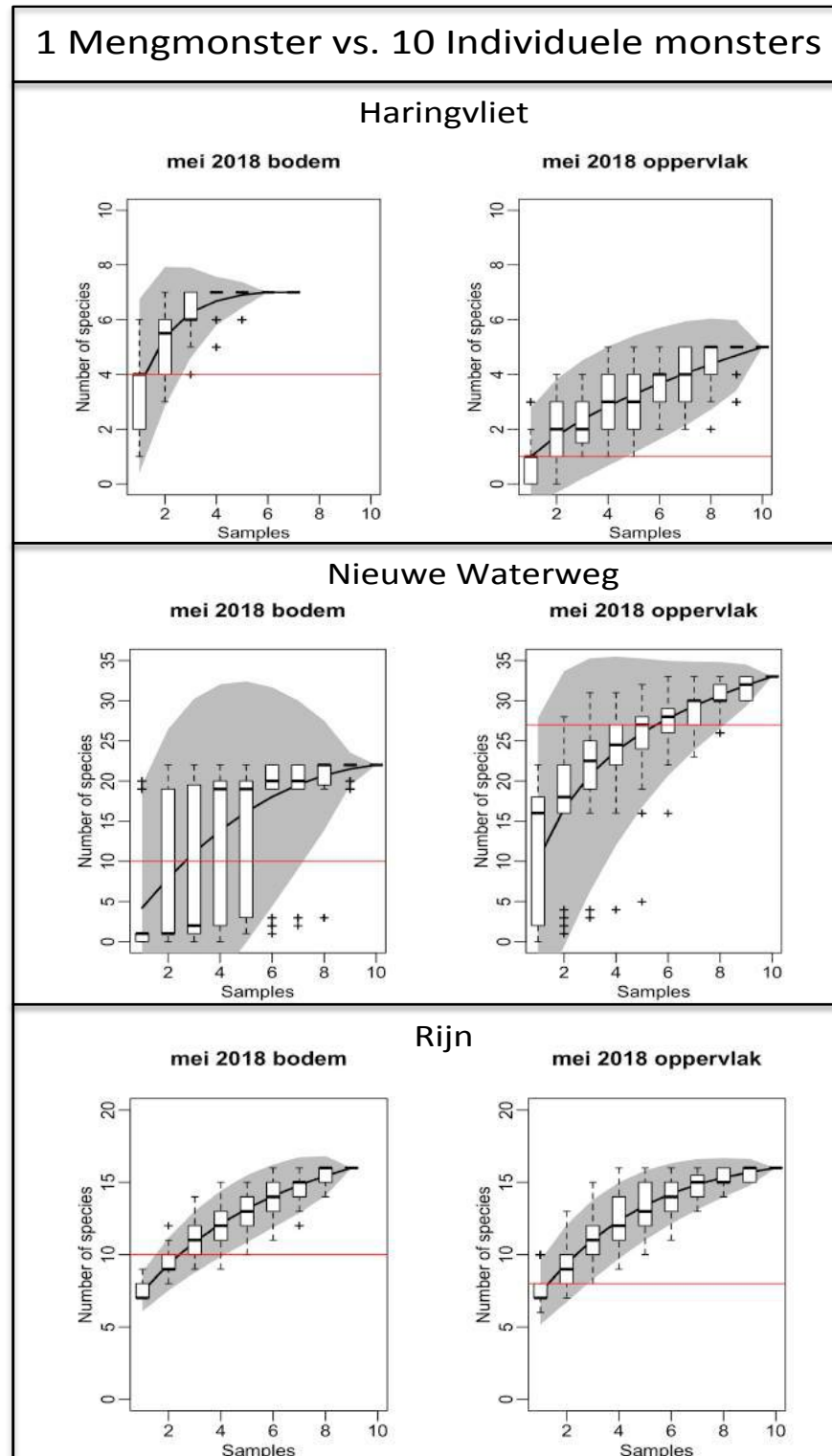
Figuur 4.4. Soortenverzadigingscurves voor **doelsoorten** in de Haringvliet, Nieuwe waterweg en Rijn op basis van de detailbemonstering in mei en oktober 2018.



Figuur 4.5. Weergave van het werkelijk aantal waargenomen doelsoorten in mei en oktober in de detailbemonstering (Haringvliet, Rijn en Nieuwe Waterweg) en het geschatte aantal soorten op basis van de jackknife procedure.

Effectiviteit van één mengmonsters versus tien individuele monsters

Tijdens de detail monstercampagne is voor elke waterlichaam op één locatie gelijktijdig een mengmonsters verzameld met tien individuele monsters in hetzelfde habitat. Een mengmonsters is een samengesteld monsters van tien deelmonsters waarbij elk deelmonster op dezelfde plek en tijd is verzameld als één van de tien individuele monsters. Alleen het monstervolume verschilt, elke deelmonster bestaat uit 100mL water, elk individueel monster uit 1 L water. Het idee achter een samengesteld mengmonster is dat de soortengemeenschap van de tien deelmonsters vergelijkbaar is met tien losse individuele monsters. De studieopzet maakt het mogelijk om de effectiviteit van één samengesteld mengmonster te vergelijken met de effectiviteit van tien losse individuele monsters in hetzelfde habitat (bodem, oppervlak). De resultaten van deze vergelijking zijn weergegeven in Figuur 4.6.



Figuur 4.6. Vergelijking van de soortenrijkdom (doelsoorten) van één samengesteld mengmonster (rode lijn) met de soortenverzadingscurve van tien individuele monsters, verzameld op dezelfde plek in hetzelfde habitat (bodem, oppervlak) in de maand mei voor Haringvliet, Nieuwe waterweg en Rijn.



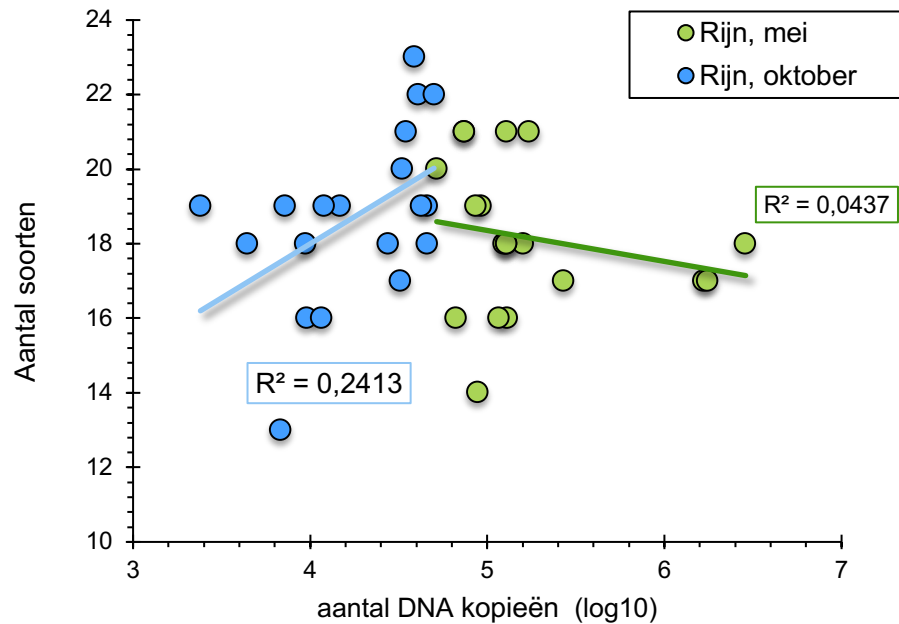
Op basis van figuur 4.6 is duidelijk dat in de maand mei het aantal doelsoorten dat met één samengesteld mengmonster van 10 x 100mL stelselmatig lager ligt dan het aantal doelsoorten dat op basis van tien individuele monsters van 1 L wordt aangetroffen. Dit is zichtbaar voor zowel het habitat oppervlak als bodem, in alle drie de waterlichamen.

Een samengesteld mengmonster levert dus een aanzienlijk lagere soortenrijkdom op dan op basis van losse individuele monsters wordt verkregen van dezelfde plek. Dit kan verklaard worden de verdunning die mogelijk optreedt als gevolg van het mengen van DNA dat niet in alle deelsamples even homogeen verdeeld is. Aansluitend kan binnen de PCR-reactie ook een soort competitie op treden, waarbij het ene DNA-molecuul makkelijker amplificeert dan de andere.

4.5 Effect van eDNA concentratie

Concentratie eDNA en aangetroffen soorten

Er is geen significant verband gevonden tussen het aantal DNA-kopieën (“DNA-concentratie”) en soortenrijkdom tijdens de bemonstering in mei (lm: $R^2=0.04$, $p=0.39$), In oktober is er wel een significant verband gevonden (lm: $R^2=0.24$, $p=0.033$) en neemt het aantal soorten toe met de DNA kopie aantallen. Het absolute aantal DNA-kopieën is significant hoger in mei vergeleken met oktober (ANOVA: $F=44.26$, $p<0.001$), waardoor er dan mogelijk geen effect van DNA-concentratie op het aantal gedetecteerde soorten waarneembaar is. Deze resultaten wijzen erop dat bij lagere absolute hoeveelheden DNA er rekening gehouden moet worden met een lagere trefkans op soorten. Er is onvoldoende data verzameld om een betrouwbare uitspraak te doen hoeveel DNA-kopieën er minimaal nodig zijn voor een redelijke trefkans.



Figuur 4.9: Relatie tussen aantal DNA-kopieën (ddPCR van KWR) en soortenrijkdom voor de Rijnbemonstering in mei (groen cirkels) en oktober (blauwe cirkels).

4.6 Bruikbaarheid eDNA monster

Aantal bruikbare eDNA monsters

Tijdens de seizoensbemonstering zijn er 162 eDNA monsters genomen. De labanalyse van 97 van deze monsters resulteerde in >300.000 fish reads, waardoor 60% van de genomen monsters kwalificeert als kwalitatief goed monster. Daarentegen leverde 14 van deze monsters (9%) geen reads op na de Python pipeline.

Tijdens de detailbemonstering zijn er 120 eDNA monsters genomen. De lab analyse van 57 van deze monsters resulteerde in >300.000 fish reads, waardoor 48% van de genomen monsters kwalificeert als kwalitatief goed monster. Daarentegen leverde 22 van deze monsters (18 %) geen reads op na de python pipeline.

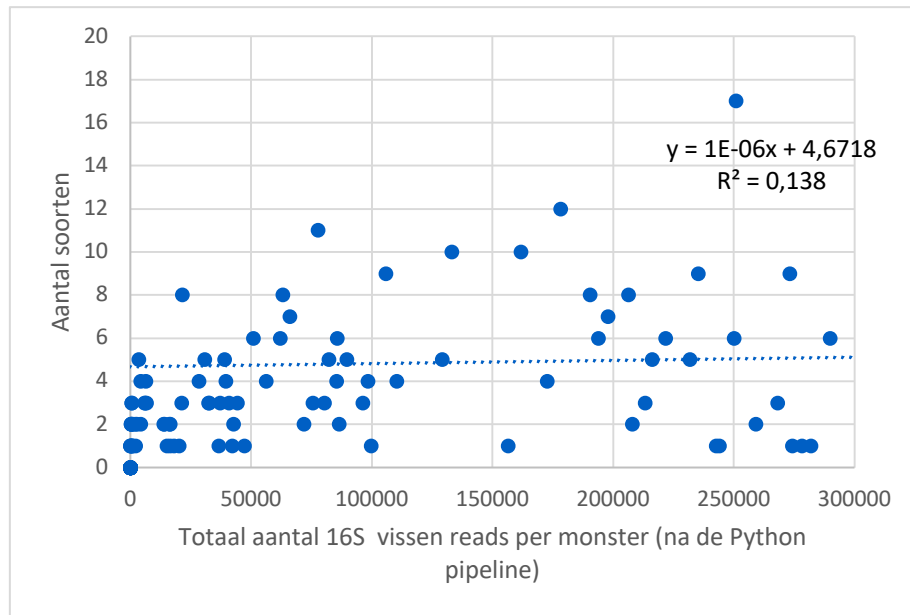
De oorzaak van “slechte” monsters kan veroorzaakt worden in alle gemaakte stappen, zowel in de veldfase als in de laboratoriumfase. Bijvoorbeeld door de wijze waarop monsters zijn samengevoegd in de DNA sequencing library. Een oplossing voor dit probleem wordt aangedragen in de discussie. Bij het opzetten van een bemonsteringsstrategie moet rekening gehouden worden met het feit dat een klein percentage van de monsters (9 -18 %) niet de gewenste informatie zullen opleveren.

Aantal eDNA copies

Soortenrijkdom varieert sterk met het totale aantal fish reads per sample. Een hoger totaal aantal fish reads leidt niet automatisch tot de detectie van meer



soorten. Monsters waarin minder dan 100.000 reads verkregen werden gaven relatief weinig soorten.





5 Discussie & conclusies

Het voorliggend onderzoek laat zien dat met behulp van eDNA metabarcoding soortenlijsten kunnen worden gegenereerd voor de drie onderzochte waterlichamen. Deze soortlijsten leveren aanvullende informatie ten opzichte van de traditionele monitoring, namelijk een hoger aantal (doel)soorten en/of andere vissoorten. De bemonsteringen en lab analyses zijn volgens plan verlopen. In het onderstaande worden verschillende aspecten nader toegelicht, waarbij de hoofdvraagstellingen uit de inleiding centraal staan.

5.1 Geschiktheid van eDNA metabarcoding

Vergeleken met traditionele monitoring worden er meer soorten gedetecteerd met eDNA metabarcoding. Er zijn overeenkomsten en verschillen. Dit geldt ook voor de traditionele monitoringsmethoden onderling (passieve en actieve vismonitoring). Per waterlichaam zijn verschillende habitats onderzocht (oppervlakte, bodem, oever). Uit de resultaten blijkt dat het gemiddeld aantal soorten tussen habitats nauwelijks verschilt, met uitzondering van een bodemmonster uit de Nieuwe Waterweg waar beduidend minder soorten aangetroffen werden dan in overige monsters.

Ten aanzien van soortsamenstelling zijn er wel degelijk verschillen tussen habitats. Wanneer verschillende habitats worden bemonsterd zal het aantal gedetecteerde soorten toenemen, als gevolg waarvan de waargenomen soortenrijkdom van een waterlichaam toeneemt. Ook de bemonstering van meerdere locaties (plaatsen in het waterlichaam) leidt tot een hogere soortenrijkdom.

De soortenrijkdom in de tijd is stabiel in de Rijn en de Haringvliet. De Nieuwe Waterweg laat wel een seizoensdynamiek zien: een hoge soortenrijkdom in maart die afneemt richting de zomer en weer toeneemt richting november.

Het cumulatieve effect van het bemonsteren van verschillende habitats op de soortenrijkdom en wisselende soortsamenstelling gedurende seizoenen duidt op een heterogene verdeling van eDNA in het water. Voor alle locaties geldt daarom dat er voldoende inspanning moet worden geleverd om een zo volledig mogelijk beeld te krijgen van de soortrijkdom. Uit de soortverzadingscurve van de Rijn (Figuur 4.4) blijkt dat er minimaal 15 individuele monsters van 1L nodig zijn om een volledig beeld te krijgen, terwijl in de Nieuwe Waterweg en Haringvliet met 20 individuele monsters van 1L nog geen verzadiging wordt bereikt. Nadere analyse middels simulatie kan een indicatie geven van het aantal samples dat essentieel is om verzadiging te bereiken. Tevens blijkt dat tien losse individuele monsters (10 x 1L) een aanzienlijk hogere soortenrijkdom opleveren dan op basis van één samengesteld mengmonster (10x 100mL) wordt verkregen binnen hetzelfde habitat (Figuur 4.6). Hoogstwaarschijnlijk speelt het genomen watervolume hierbij een rol.

Het gebruik van de 16S primers levert consequent meer (doel)soorten op dan de 12S primers van Datura Molecular Solutions. Echter, de combinatie van beide



primer sets leveren de meeste (doel)soorten op. Wanneer beide primersets in één PCR reactiebuisje uitgevoerd worden zouden de extra kosten beperkt zijn tot de analyses van de metabarcodingdata.

Wanneer er voldoende watermonsters binnen een waterlichaam worden geanalyseerd, kan met behulp van eDNA een representatief kwalitatief beeld verkregen worden van de vissoorten in rijkswateren. Binnen het huidige traditionele KRW-visstandonderzoek wordt eveneens een kwalitatief (en kwantitatief) beeld verkregen van de visstand. Voor traditionele monitoring geldt dat een kwalitatief beeld verkregen wordt ter plaatste van de bemonsteringen. Voor bemonstering met eDNA geldt dat het vooralsnog niet bekend is in hoeverre het gedetecteerde eDNA van soorten ook daadwerkelijk afkomstig is van individuen in de nabije omgeving. Hiermee dient bij de ontwikkeling van een aangepast toetsingskader rekening gehouden te worden.

Sterke punten eDNA metabarcoding

- **Objectiviteit:** de verkregen ruwe sequentie data is objectief, in tegenstelling tot data verkregen via traditionele monitoring (afhankelijk van interpretatie visser). Tevens kunnen de data met voortschrijdend inzicht (o.a. referentiedatabase) herinterpreteerd worden.
- **Herhaalbaarheid:** een studiedesign waarin eDNA metabarcoding wordt gebruikt is relatief eenvoudig te repliceren, mits alle randvoorwaarden tot in detail zijn vastgelegd.
- **Standaardisatie:** aangezien het eDNA werkveld internationaal sterk in ontwikkeling is, is het mogelijk om de verschillende stappen in het veld en in het lab verder te standaardiseren (en “fool”-proof te maken) en daarmee een goed beeld van de variatie in soortenrijkdom in de tijd te krijgen.

Zwakke punten eDNA metabarcoding

- **Betrouwbaarheid:** Er bestaat een kans dat een deel van de (zeer) zeldzame soorten van elders afkomstig is. Het is onduidelijk of aangetroffen soortenrijkdom daadwerkelijk is toe te schrijven aan lokaal aanwezige soorten. De uiteindelijke soortenlijst is afhankelijk van (arbitraire) keuzes gemaakt tijdens de bio informatica stappen (Obitools en Python pipeline) en ecologische interpretatie.
- **Gevoeligheid:** fouten zijn makkelijk introduceerbaar, maar te vermijden met standaardisatie en de juiste controlestappen. Bijvoorbeeld het gebruik van een positieve controle tijdens de PCR analyse om de efficiënte van de PCR in kaart te brengen.
- **Verschillen tussen laboratoria:** Ondanks een groot overlap in soortrijkdom, is het niet vanzelfsprekend dat verschillende laboratoria dezelfde resultaten opleveren.



5.2 Betrouwbaarheid eDNA i.r.t. misinterpretatie positieve waarnemingen

eDNA metabarcoding is in principe een betrouwbare methodiek om een kwalitatief beeld te geven van de visstand. Zoals hierboven vermeld dient wel de geografische schaal waarvoor dit kwalitatieve beeld geldt, nader te worden gedefinieerd. Daarnaast geldt dat eDNA metabarcoding gevoelig is voor misinterpretatie van positieve waarnemingen. Zoals in tabel 4.1 reeds samengevat is weergegeven, zijn er een aantal oorzaken te noemen die in bepaalde mate misinterpretatie veroorzaken. De kans op misinterpretatie door oorzaken in het lab lijkt klein tot zeer klein. De kans op misinterpretatie lijkt voornamelijk het gevolg van oorzaken in het veld en te spelen tijdens het nemen van monsters. Misinterpretatie als gevolg van het inbrengen van gebiedsvreemd DNA door veldwerkers, kan worden geminimaliseerd door de nodige maatregelen te treffen en veldcontroles uit te voeren. Misinterpretatie door de overige veld oorzaken zijn moeilijk controleerbaar en waarschijnlijk ook niet constant, zeker niet in rijkswateren die sterk onder invloed staan van antropogene verstoringen. Misinterpretatie kan echter wel geminimaliseerd worden door onderzoek te doen naar het effect van eDNA vervuiling door o.a. scheepvaart, lozingen en afval van consumptievis.

5.3 Kostenefficiënte uitvoering eDNA metabarcoding

eDNA metabarcoding voor onderzoek naar vissen in rijkswateren levert kwalitatieve resultaten op met betrekking tot soortensamenstelling op basis van in het water aanwezig DNA. De traditionele monitoring met fuiken (passieve monitoring) levert zowel kwalitatieve als kwantitatieve resultaten, gebaseerd op werkelijke vangsten. De resultaten van de eDNA methode zijn daarmee wezenlijk anders dan de resultaten die worden gegenereerd door de traditionele methoden. De kosten voor eDNA onderzoek zijn dan ook lastig te vergelijken met de kosten voor traditioneel visstandonderzoek omdat de output van de onderzoeken verschillend is.

Om toch enig inzicht te krijgen hoe zich de kosten verhouden tussen de methodieken, wordt hiervoor in onderstaande tabel een beknopt overzicht weergegeven. Er wordt hierbij van uitgegaan dat de werkzaamheden worden uitgevoerd door professionele onderzoekers.

Tabel 5.1. Indicatie van het verschil in kosten tussen eDNA metabarcoding i.v.m. fuiken. - = geen kosten, + = lage kosten, ++ = hoge kosten.

Werkzaamheden	eDNA	Fuiken (passieve monitoring)	Opmerking
Veldbemonstering	+	++	Verskil in kosten wordt met name veroorzaakt door benodigde hogere inspanning bij fuikmonitoring.
Labanalalyse	++	-	
Data-analyse	+	+	Uitgangspunt is dat bioinformatica volgens een standaard format wordt uitgevoerd.
Materiaal	+	+	Fuiken o.b.v. afschrijving vs. handmatig samengestelde eDNA monsterkits voor eenmalig gebruik.
Rapportage	+	+	



6 Kennisleemten en aanbevelingen

In dit hoofdstuk worden aanbevelingen gedaan en toegelicht voor de uitvoering van eDNA monitoring in de toekomst. Deze aanbevelingen dienen onder andere als basis van het (concept) RWS-V (bijlage 7).

6.1 Veldbemonstering

- *Aantal monsters:* alhoewel de 20 detailmonsters voor de Nieuwe Waterweg en Haringvliet niet voldoende waren om minimale aantal monsters te bepalen dat benodigd is om verzadiging te bereiken, is het mogelijk om via simulatie (iNext package in R-studio) te bepalen of een verdubbeling van het aantal monsters wel tot verzadiging leidt. Schatting is dat voor de Rijn en Haringvliet 15 monsters voldoende zijn om circa 90% van alle soorten te detecteren. De Nieuwe Waterweg is een soortenrijker systeem. Hier zijn circa 25 monsters nodig om een goed beeld te verkrijgen.

- *Bemonstering strategie:* om tot een zo groot mogelijke soortenrijkdom te komen wordt geadviseerd om verschillende, ruimtelijk verspreide locaties (bv. oever met vegetatie, in een krib vak, in een haven/ bij monding van een haven, oever met stortstenen, enz.) te bemonsteren.

Het nemen van een bodemonster vergt veel meer inspanning en introduceert extra risico op contaminatie vergeleken met een oppervlakte of oever monster. Daarnaast leverde een bodemonster een beperkt aantal unieke soorten (1 tot 6) en doelsoorten (1-2) op. Monsters kunnen dus aan de oppervlakte verzameld worden. Er zijn geen statistisch significante verschillen gevonden in gemiddelde soortenrijkdom tussen de oevermonsters (individueel monster van 1X 1L aan de oever) en de oppervlakte monsters (mengmonster van 10X 100mL, verspreid over de breedte van de rivier). De meerwaarde van het combineren van meerdere deelmonsters tot één mengmonster lijkt dus beperkt. Meerdere individuele monsters leveren echter wel meer op.

- *Monstervolume:* op basis van het onderliggende onderzoek zijn geen heldere uitspraken te doen omtrent het ideale monstervolume. Het aantal doelsoorten dat op basis van tien individuele monsters van 1 L wordt aangetroffen bleek stelselmatig hoger dan op basis van één samengesteld mengmonster van 10 x 100mL. Aangezien de monsters gelijktijdig zijn genomen en ook met eenzelfde ruimtelijk spreiding van de monsterpunten, kan worden geconcludeerd dat het verzamelen van tien monsters van 1 L meer oplevert dan één mengmonster van 1 L. Het is niet onderzocht of tien individuele monsters van 1L een vergelijkbaar resultaat leveren dan 1 mengmonster van 10L (met deelmonsters van 1L). In ieder monster wordt een deel van de soorten die in lage concentratie voorkomen, weggedrukt als gevolg van verdunning van het aanwezige eDNA en competitie die optreedt tijdens de PCR. De verwachting is daarom dat 10 losse monsters van 1L meer opleveren dan één monster van 10L. Ook is de DNA-opbrengst afhankelijk van het type



en de capaciteit van het filter dat gebruikt wordt. Het type filter dat gebruikt is in het huidige onderzoek betreft een *bottle top* filter met een capaciteit van minimaal 1L. Met behulp van deze filters wordt al het eDNA (met uitzondering van vrij zwevend DNA) uit het water gefilterd. Het filteren van 10L gebeurt met een crossflow filter. Cross-flow filters bemonsteren slechts een klein deel (op basis van deeltjesgrootte) van het eDNA. Echter kan het volume dermate vergroot worden (tot tientallen liters) dat de totale eDNA opbrengst gelijk, of zelfs groter is. Nadeel: cross-flow filters zijn relatief duur.

- *Bemonstering strategie:* om tot een zo groot mogelijke soortenrijkdom te komen is het aan te raden om verschillende, ruimtelijk verspreide locaties (bv. oever met vegetatie, in een kribvak, in een haven/ bij monding van een haven, oever met stortstenen, enz) te bemonsteren. Het nemen van een bodemmonster vergt veel meer inspanning dan een oppervlakte of oever monster en leverde een beperkt aantal unieke soorten (1 tot 6) en doelsoorten (1-2) op.
- *Verstoringen:* Het gemiddeld aantal gedetecteerde soorten in de bodemmonsters van de Nieuwe Waterweg was onverwacht laag, terwijl de gemiddelde soortenrijkdom in de bodemmonsters van de Rijn en het Haringvliet niet significant verschillend was. Nader onderzoek zou kunnen bepalen of dit een correcte observatie is of dat er verstoring opstreed door zoutgehalte en/of organische stoffen.
- *Contaminatie:* de kans op contaminatie in het veld kan beperkt worden door het gebruik van dichte filter capsules. Zo zijn er nieuwe filtercapsules beschikbaar gekomen (Thomas et al. 2019) waarmee een filter in een gesloten unit zit. Na filtering droogt dit filter op waardoor het eDNA geconserveerd wordt. Na de filtering hoeven in het veld geen extra handelingen uitgevoerd te worden. Potentieel verkleint deze werkwijze de kans op contaminatie in het veld behoorlijk. Mochten filters in het veld toch overgebracht worden naar buisjes dan is aan te raden om de monsters per bemonsteringsgebied in een aparte opslagdoosjes te verzamelen. Filters in een gesloten filtercapsule kunnen continu water door het filter zuigen. Door tegelijkertijd een traject te varen kan eenvoudig ruimtelijke variatie geïntroduceerd worden die vergelijkbaar is met het verzamelen van meerdere deelmonsters.

Daarnaast is het aan te bevelen om de bemonstering uit te voeren tijdens gunstige weersomstandigheden en rekening te houden met externe vervuilingbronnen zoals afvalwater (RWZI, visrestaurants) en scheepvaartverkeer. Tenslotte is het aan te bevelen dat het vaartuig niet gebruikt wordt voor biologische bemonsteringen van vis zodat het niet in aanraking kan komen met hoge concentraties DNA van vissen. Als laatste verdient het de aanbeveling om kleding te dragen die niet gedragen wordt bij het uitvoeren van andere biologische bemonsteringen zodat contaminatie via kleding beperkt kan worden.

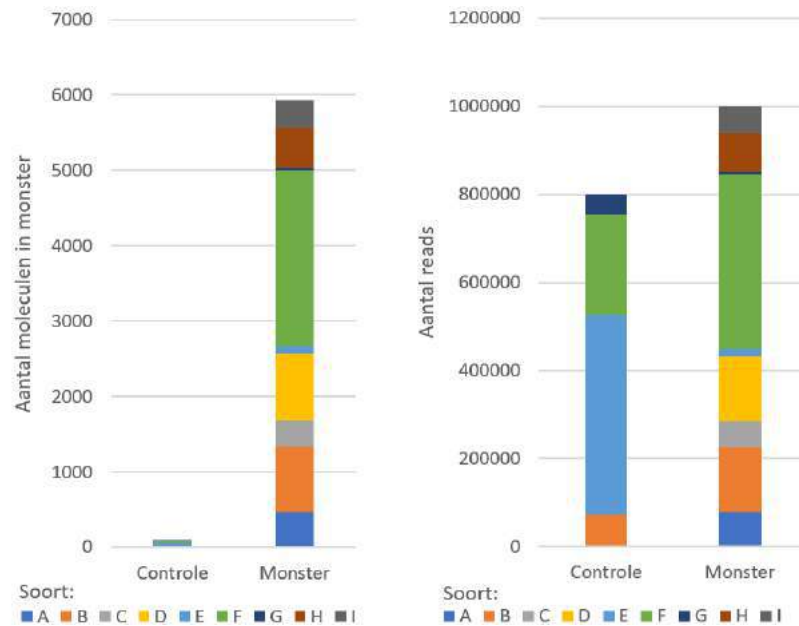


6.2 Lab analyse

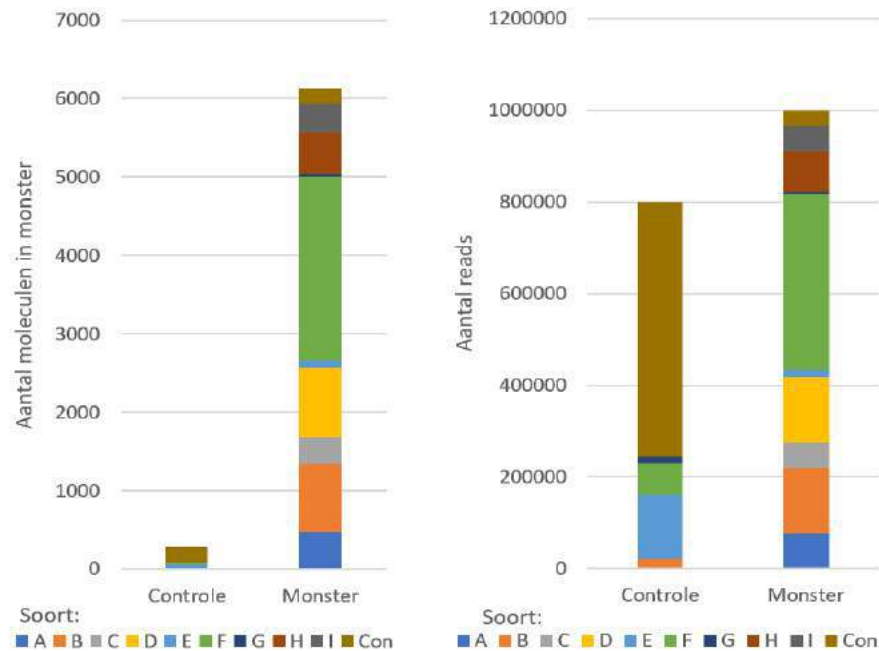
- *Positieve controle:* het meenemen van een positieve controle (i.e. DNA van referentievis) tijdens de PCR stappen om de efficiëntie van de PCR in kaart te brengen en daarmee de kwaliteit van de resultaten.
- *Certificering laboratoria:* door middel van het aantoonbaar meedoen met zogenaamde “ring”-tests waarbij verschillen tussen laboratoria inzichtelijk gemaakt kunnen worden middels het vergelijken van een standaard sample. (o.a. verschillen door referentie database en Python pipeline).
- *Strikt gescheiden labs:*
 - Laboratoriumruimte 1. De monsterkits, buffers en PCR-reagentia dienen te worden voorbereid in een ruimte waarin geen DNA monsters verwerkt worden.
 - Laboratoriumruimte 2. De eDNA monsters dienen geëxtraheerd te worden in ruimtes waarin gaan ander type DNA-monsters geëxtraheerd worden, of geëxtraheerd zijn. Dit voorkomt contaminaties met DNA-bronnen van hoge concentratie.
 - Laboratoriumruimte 3. In deze ruimte vinden weefselextracties plaats voor het opbouwen van referentie en ten behoeve van het samenstellen van een mock community.
 - Laboratoriumruimte 4. Hier wordt de PCR en gel-elektroforese uitgevoerd en wordt DNA sequencing library voorbereid. Tevens vindt hier DNA sequencing plaats.
- *Luchtcirculatie:* de analyses in het huidige onderzoek zijn uitgevoerd in ruimtes die niet voorzien zijn specifieke luchtcirculatie. In vervolgstudies dient in laboratorium 1 en 2 sprake te zijn van overdruk waardoor geen DNA-moleculen de ruimte binnen kunnen dringen. De lucht die naar binnen geblazen wordt dient gefilterd te zijn middels een HEPA-filter. In laboratorium 3 en 4 dient sprake te zijn van onderdruk zodat de hoge concentraties DNA die in deze ruimtes aanwezig zijn direct afgevoerd worden naar buiten. Zodoende kan de kans verkleind worden dat DNA-moleculen terecht komen in de DNA-vrije laboratorium en het eDNA laboratorium.
- *Eenrichtingsverkeer in de laboratoria:* materialen die gebruikt zijn in een laboratorium mogen niet verplaats worden naar een laboratorium met een lager vervuilingsniveau. Ook is het aan de raden dat de analisten die werkzaam zijn in het PCR-laboratorium het laboratorium 1, 2 en 3 niet betreden.
- *Voorkomen van contaminatie van PCR-producten onderling:* eDNA fragmenten wordt gedurende de eerste PCR reeds voorzien van unieke indexen. Daardoor kan van ieder molecuul vastgesteld worden van welk monster deze afkomstig is. Belangrijk dat elke index slechts eenmaal gebruikt wordt per DNA sequencing library (die uniek gelabeld wordt tijdens de tweede PCR). Zodoende kunnen contaminaties tussen PCR-producten voorkomen worden en kunnen crossing-over (een bepaald type PCR-fout) herkend worden.



- *Interne standaard:* In diverse veldcontrole monsters is DNA gedetecteerd van vissen als gevolg van contaminatie gedurende het proces van bemonsteren en monsterverwerking in het laboratorium. Het is echter onduidelijk hoe hoog de concentraties vervuiling precies zijn. Dit is een gevolg van de gevoeligheid van de PCR. Slechts enkele moleculen DNA zijn genoeg om gedetecteerd te worden. Als gevolg hiervan zegt het aantal reads weinig over de initiële hoeveelheid DNA in de monsters. In een pilot buiten het huidige project om is aangetoond dat het werken met een interne standaard uitkomst bij het onderscheid maken tussen “achtergrond signaal” dat geïntroduceerd wordt tijdens de bemonstering en de laboratoriumprocedure en eDNA dat aanwezig was in het watermonster. Hierbij wordt een bekende concentratie artificieel DNA toegevoegd aan iedere PCR-reactie van de eDNA samples. Op basis van deze interne standaard zou het absolute aantal moleculen berekend kunnen worden (zie figuur 6.1 en 6.2). Het aantal moleculen dat gemeten wordt in de negatieve lab- en veldcontroles kan vervolgens afgetrokken worden van de gemeten concentraties eDNA in de monsters.



Figuur 6.1. Fictief voorbeeld zonder interne standaard. In de linker grafiek wordt het aantal DNA-moleculen van verschillende vissoorten (A t/m I) in de veldcontrole en een watermonster getoond. In de rechter grafiek wordt het aantal reads in de veldcontrole en een watermonster getoond. Ondanks dat het aantal vismoleculen erg laag was in de veldcontrole vergeleken met het watermonster, is dit verschil niet inzichtelijk als gekeken wordt naar het aantal reads in de veldcontrole en het watermonster: een zeer beperkt aantal DNA-moleculen in de controle wordt opgeblazen als gevolg van de gevoeligheid van de PCR.



Figuur 6.2. Fictief voorbeeld met interne standaard van bekende concentratie. Linker figuur: een bekende hoeveel DNA-moleculen van de standaard (bruin) is toegevoegd aan de veldcontrole en het watermonster. Rechterfiguur: DNA-moleculen van de standaard in de veldcontrole zijn sterk opgeblazen (i.e. leveren veel meer reads) vergeleken met dezelfde hoeveelheid DNA-moleculen van de standaard in het watermonster.

- *Monsters met weinig eDNA reads:* het aantal monsters met weinig reads (ondanks goede kwaliteit van de monsters) kan verkleind worden door het poolen van monsters in de DNA sequencing library op basis van een gelijke hoeveelheid moleculen in plaats van een gelijk volume PCR-product.
- *Contaminatie tijdens lab analyse:* Om het risico op contaminaties die ontstaan tijdens de laboratoriumprocedure te verkleinen, is het aan te raden om monsters te verwerken in kleine batches van circa 12 monsters.

6.3 Markerkeuze

- *Combineren van twee markers:* structureel werden meer soorten gedetecteerd door het combineren van twee markers; 12S en 16S. Het is dus aan te raden om ook in de toekomst twee markers te combineren. Nadeel van de 12S en 16S markers die gebruikt zijn in het huidige onderzoek is dat de resolutie niet voldoende is om onderscheid te maken tussen schol en bot. Echter kan in de Rijn verondersteld worden dat deze detecties afkomstig zijn van bot. Verder kunnen ook blauwneus en kolblei niet onderscheiden worden. Een aantal soorten kan niet onderscheiden worden met 12S, maar wel met de gebruikte 16S marker. Dat gaat onder andere om baars/snoekbaars en alver/gestippelde alver.



6.4 Referentiedatabase

- *Investeren in referentiedatabase.* De referentie databases dienen compleet te zijn voor de soorten van interesse. Het is van belang dat het uitvoerende laboratorium beschikt over een volledige referentie database.

6.5 Bio informatica

- *Python pipeline:* gebruik zowel de mock samples, negatieve controles en positieve controles voor het afstemmen van de instellingen van de Python pipeline. Detecties in negatieve controles zijn onwenselijk, alsook het missen van soorten in de positieve controles (mock en DNA van referentievis). In meest gepubliceerde data wordt alleen Obitools gebruikt, echter in deze publicaties worden slechts enkele samples geanalyseerd. Aanvullende pipeline is mogelijk noodzakelijk vanwege het groot aantal monsters.
- *Drempelwaardes:* op basis van de mock community kon vastgesteld worden dat de drempelwaardes in het huidige onderzoek te hoog ingesteld zijn. In de toekomst dienen drempelwaardes afgestemd te worden op de gebruikte bemonsteringsmethode- en strategie, en gevalideerd te worden op basis van een mock community. Drempelwaardes dienen dus nader vastgesteld te worden. Idealiter worden drempelwaardes zo laag mogelijk gehouden. Verkend kan worden of het aantal DNA-moleculen in de monsters (zoals berekend op basis van een interne standaard) gecorrigeerd kan worden op basis van het aantal DNA-moleculen in de controles.
- *Kwaliteitscontrole:* duidelijke criteria opstellen waarmee wordt beoordeeld wanneer een monster wel of niet wordt meegenomen in de data-analyse. Bijvoorbeeld, voor monsters met geen enkele (0) fish reads kan worden uitgesloten dat dit een vals negatief resultaat is wanneer er wel ruis en/of een referentiesoort (positieve controle) wordt gedetecteerd in het monster.



7 Literatuur

- Dorenbosch, M., P.B. Broeckx (2016). Ecologisch functioneren van een drijvend eiland. Tussenrapportage 2015 KRW proef stadshaven Rotterdam. Rapportnr. 15-257, Bureau Waardenburg, Culemborg.
- Dorenbosch, M. (2017). eDNA bemonstering vissen bij de Flakkeese spuisluis. Notitie 17-0010 Bureau Waardenburg, Culemborg.
- Efron, B. and Tibshirani, R. (1993) An Introduction to the Bootstrap. Chapman and Hall, New York, London.
- Griffioen B., K. van Bochove (2018). Pilot: eDNA monitoring grote rivieren. Wageningen Marine Research & Datura, Wageningen, in voorbereiding.
- Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. van Delft, P.F. Thomsen en P. Taberlet., (2014). Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-104.
- Hootsmans, M.J.M. Kamp, M. van der Wullings, B.A. Atsma, G. Gubbels, R. Koole, M. Tolkamp, H. Bogert, T. van den, 2017. Monitoring van vismigratie met eDNA. KWR rapport - KWR 2017.095.
- Kardinaal, E., K. Learbuch, B. Wullings, E. Wallaart, J. Warmink, W. Patberg & J. Wanink (2014). Vismonitoring aan de hand van eDNA. Rapportnr 2014.097, KWR Nieuwegein
- Molen, D.T. van der; R. Pot; C.H.M. Evers; F.C.J. van Herpen & L.L.J. van Nieuwerburgh (eds.) (2018). Referenties en maatlatten voor natuurlijke watertypen voor de Kaderrichtlijn water 2021-2027. Stowa rapport 2018-49.
- Moyer, Gregory R., et al. (2014). Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. PloS one 9: e103767.
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., Deiner, K., Mahon, A. R., Brueseke, M. A., Shirey, P. D., Pfrender, M. E., Lodge, D. M. and Lambertini, G. A. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecol Evol*, 6: 4214–4226. doi:10.1002/ece3.2186.
- Patberg, W., Warmink, J., Wullings, B.A., Kardinaal, W.E.A., Ruiter, H. – Met DNA visstand monitoren op de grote rivieren – Water Matters (2016) april, p.39-42.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R.M. and Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *J Appl Ecol*, 51: 1450–1459. doi:10.1111/1365-2664.12306 .
- Renshaw, M. A., Olds, B. P., Jerde, C. L., McVeigh, M. M., and Lodge, D. M. (2015). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular ecology resources*, 15(1), 168-176.
- Roussel, J.M. J.M. Paillisson, A. Treguier, E. Petit, (2015). The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology*, 52: 823-826.
- Thomas, A. C., Nguyen, P. L., Howard, J., & Goldberg, C. S. (2019). A self-preserving, partially biodegradable eDNA filter. *Methods in Ecology and Evolution*.



- Thomsen, P. F., Møller, P. R., Sigsgaard, E. E., Knudsen, S. W., Jørgensen, O. A., and Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PloS one*, 11(11), e0165252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165252>.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A. J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E. and Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, 25: 929–942. doi:10.1111/mec.13428.
- van Bochove, K. (2015a). eDNA metabarcoding vissen te Rotterdam. Rapportnr. RA2015141-1, Datura, Delft.
- van Bochove K. (2015b). eDNA metabarcoding vissen rond het sluiscomplex te IJmuiden. Rapportnr RA2015141-1, Datura, Delft.
- van der Kamp, M., Beers, M., Hootsmans, M.J.M., Wullings, B.A. – Monitoring van vispopulaties met EDNA: de NL-vispopulatiescan als kansrijke benadering – *WaterMatters* (2018)juni p.12-15.



Bijlage I Uiteenzetting laboratorium werkzaamheden

Gedetailleerde uiteenzetting van het stappenplan binnen het eerste hoofdproces 'Next Generation Sequencing'. * zie § 2.4.1, ** zie § 2.4.2.

1) Next Generation Sequencing	
1a) eDNA extractie *	Het eDNA is geëxtraheerd door middel van een phenol-chloroform DNA extractie. Gedurende de extractie lost het filter op waardoor al het DNA vrij komt. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhinderen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extractie zijn deze inhiherende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.
1b) eDNA amplificatie **	Vervolgens is het eDNA van vissen sterk geamplificeerd middels PCR. Hiervoor zijn 2 sets primers gebruikt die beide een kort fragment (~100 bp) van het mitochondriaal DNA vermeerderen. Deze primers richten zich op het 12S en 16S rRNA gen. De primers bevatten een unieke tag (7 nucleotiden). Gedurende de bioinformatica analyse kunnen de reads aan de hand van deze tags toegewezen worden aan het juiste sample. De PCR is uitgevoerd met behulp van de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). De PCR is uitgevoerd met twaalf replica's.
1c) Gelelektroforese	Door middel van gelelektroforese is vastgesteld of de PCR geresulteerd heeft in PCR producten van de juiste lengte.
1d) Poolen PCR producten	PCR producten zijn samengevoegd met maximaal 30 samples per pool.
1e) Illumina Nextera XT adaptors	Middels van een tweede PCR zijn Illumina Nextera XT adaptors aan de pools van PCR producten gezet.
1f) DNA library samenstellen	Vervolgens zijn verschillende pools samengevoegd tot één "DNA library".
1g) DNA library zuiveren	De DNA sequencing library is gezuiverd middels SPRI-based size selection. Daarbij zijn korte fragmenten zoals primers verwijderd uit de DNA library.
1h) DNA library: kwaliteit en concentratie	Door middel van qPCR en een bioanalyzer run is de kwaliteit en concentratie van de DNA library vastgesteld.
1i) Clustering flow cell	De DNA library is verdunt, om optimale clustering op de flow cell van de sequencer te bewerkstelligen.
1j) Next Generation Sequencing	De PCR producten zijn gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing. Hierbij worden miljoenen stukjes (zogenoemde reads) van het DNA uitgelezen. In deze stap wordt het fysieke DNA in het buisje dus vertaald in digitale reads. Hierbij is gebruikt gemaakt van HiSeq 4000 of Novaseq 6000 platform (150 bp paired-end).



Gedetailleerde uiteenzetting van het stappenplan binnen het tweede hoofdproces 'Verwerking Illumina paired-end data' – bio-informatica.

2) Verwerking Illumina paired-end data	
2a) Genereren FastQ sequence files	FASTQ sequence files zijn gegenereerd met behulp van de Illumina Casava pipeline.
2b) Kwaliteitscheck	Kwaliteitscheck is uitgevoerd door middel van Illumina Chastity filtering.
2c) PhiX controle	Reads met PhiX controle zijn verwijderd.
2d) Sequenzings adapters	(Restanten van) de sequencing adapters zijn uit de reads geknipt.
2e) Kwaliteitscheck reads	De kwaliteit van de overgebleven reads is getest met de FastQC tool.
2f) Demultiplexen pools	De pools zijn gdemultiplexed op basis van de Illumina i5 en i7 indexes die toegevoegd zijn in de tweede PCR.

Gedetailleerde uiteenzetting van het stappenplan binnen het derde hoofdproces 'Sequentie analyse Obitools pipeline' – bio-informatica.

3) Sequentie analyse Obitools	
3a) Illuminapairedend	Genereren van een consensus sequentie op basis van de forward en reverse read.
3b) Obigrep	Sequenties die slecht aligned werden zijn verwijderd.
3c) NGSfilter	Op basis van de gebruikte primers en de tags die toegevoegd zijn in de eerste stap, zijn alle sequenties toegewezen aan het corresponderende sample.
3d) Obiuniq	Om de dataset die nu nog bestaat uit miljoenen reads hanteerbaarder te maken zijn alle identieke sequenties binnen een sample samengevoegd.
3e) Obigrep	Sequenties die binnen een sample minder vaak dan 10 keer voorkomen of korter zijn dan 30 bp, zijn verwijderd.
3f) Obiuniq	Alle sequenties (ook van de verschillende monsters) worden samengevoegd.
3g) Ecotag	De Ecotag tool wordt gebruikt om de sequenties te matchen met de referentie database. Deze database bevat uitsluitend gevalideerde sequenties. Vrijwel alle in Nederland voorkomende zoet- en zoutwatervissen zijn hierin opgenomen.
3h) Obiclean	De obiclean tool is gebruikt om sequencingfouten en PCR-fouten als zodanig te labelen. In de basis wordt elke waarneming het label 'singleton' (=op zichzelf staand) meegegeven. Sequentie A wordt vervolgens als 'internal' (=fout) aangemerkt als sequentie A slechts beperkt afwijkt van een sterk gelijkende sequentie B, en als sequentie A aanzienlijk minder voorkomt dan sequentie B. Sequentie B wordt vervolgens aanmerkt als 'head' (correcte sequentie). Obiclean is 4 keer uitgevoerd, met de volgende instellingen: 1. $r=0.05$ en $d=1$ 2. $r=0.005$ en $d=2$ 3. $r=0.001$ en $d=3$ 4. $r=0.0005$ en $d=4$ Hierbij staat 'r' voor het percentage dat sequentie A maximaal mag voorkomen tenopzichte van B. En 'd' staat voor het aantal verschillen tussen sequentie A en B.
3i) Obigrep	Alleen sequenties die 100% (12S) of 98% (16S) overeenkomen met één van de sequenties in de referentie database zijn beschouwd als hit. Sequenties van detecties die niet aan deze eisen voldoen zijn verwijderd uit de dataset. Dit betreffen sequencing- en PCR fouten.
3j) Ecotag	Ter controle op onverwachte soorten of onbekende genetische varianten worden sequenties die minder dan 100% overeenkomen met 12S, of <98% met 16S, zijn gematched met referentie sequenties die afkomstig zijn van NCBI Genbank. Deze referentie database is opgebouwd door de eCoPCR te runnen op alle mitochondriale sequenties, welke gedownload zijn van NCBI Genbank. Zodoende kunnen ook niet verwachte soorten (bijvoorbeeld een onbekende exoot of een exotische consumpiesoort) gedetecteerd worden, mits van de betreffende soort sequenties aanwezig zijn in Genbank. Indien een exoot gedetecteerd wordt, dan wordt deze toegevoegd aan de gevalideerde referentie database.
3k) Obitab	Tenslotte worden de resultaten geëxporteerd naar een .tab file.



*Gedetailleerde uiteenzetting van het stappenplan binnen het vierde hoofdproces
'Thresholds in Python pipeline' – bio-informatica.*

4) Thresholds in de Python pipeline	
4a) Verwijderen 'internal' detecties	Alle detecties die in één van de 4 obclean runs zijn aangemerkt als 'internal' zijn verwijderd
4b) Verwijderen detecties met laag aantal reads	Detecties worden verwijderd die bestaan uit minder reads dan de volgende ingestelde thresholds: 1. 12S: minimum van 50 reads. 2. 16S: minimum van 50 reads.
4c) Toepassen threshold verhouding vis DNA : achtergrond DNA	<p>Vervolgens is er een threshold toegepast berekend voor iedere detectie, die ook rekening houdt met de verhouding vis DNA en achtergrond DNA in een sample.</p> <p>Als er sprake is van een beperkte contaminatie vis DNA in een watermonster dat sowieso veel vis eDNA van vissen bevat, dan valt de lage concentratie contaminatie vis DNA weg tegen de veel grotere hoeveelheid vis DNA in het sample. De contaminatie wordt dan dus niet gedetecteerd. In een sample daartegen dat geen vis eDNA bevat wordt een contaminatie van enkele moleculen vis DNA (middels de PCR) uitvergroet en lijkt het alsof er veel vis DNA in het sample aanwezig was. Toch willen we onderscheid maken tussen daadwerkelijke detecties en zeer kleine vervuilingen in samples die weinig vis DNA bevatten.</p> <p>Daarom maken we gebruik van de eigenschap dat de gebruikte primers niet uitsluitend vis DNA amplificeren. Er wordt ook allerlei 'achtergrond DNA' geamplificeerd (bijv. DNA van vertebraten - mensen en koelen, overal in de lucht aanwezig - en DNA van enkele invertebraten). In een sample dat weinig vis DNA bevat verwachten we een relatief groot aandeel van achtergrond DNA. Op basis van de verhouding vis DNA : achtergrond DNA kan vastgesteld worden of het gedetecteerde DNA ruis of een daadwerkelijke detectie betreft. Achtergrond DNA wordt in feite gebruikt als een soort interne controle:</p> $\text{threshold} = A / Nw / \text{som } Fw_{\text{alle samples}} / X$ <p>Waarbij: A = totaal aantal reads in de watermonsters (exclusief de controles) Nw = aantal watersamples (exclusief de controles) Fw = fractie: aantal reads van een vis detectie gedeeld door het totaal aantal reads in het sample. som $Fw_{\text{alle samples}}$ = som van Fw van alle watermonsters conservatief (betreft een in te stellen parameter): X 16S = 1 X 12S = 1 progressief: X 16S = 30 X 12S = 25</p> <p>Detecties die onder deze threshold vallen, zijn verwijderd.</p>
4d) Berekenen DNA fractie	Vervolgens is berekend wat de fractie is van het gedetecteerde eDNA van een bepaalde soort in een sample, tenopzichte van de totale hoeveelheid vis eDNA in het sample.
4e) Samenvoegen resultaten	Daarna zijn de resultaten van de 16S en 12S marker samengevoegd door de verkregen percentages voor iedere vissoort te middelen.
4f) Toepassen laatste threshold	Tenslotte is een laatste threshold toegepast. Als een soort uiteindelijk minder dan 0,08% (conservatief) of 0,015% (progressief) voorkomt ten opzichte van het totale vis eDNA in het sample wordt de soort alsnog verwijderd.
4g) Opnieuw berekenen fractie	Na deze verwijdering wordt nogmaals de fractie berekend waarin iedere soort voorkomt.



Bijlage II Referentie databases

Overzicht van vissoorten in de referentie database van Datura Molecular Solutions en KWR (op alfabetische volgorde). Doelsoorten zijn grijs gemarkeerd. Een 'v' betekend dat de soort voor de betreffende marker niet te onderscheiden is van een andere soort. Dergelijke combinatiesoorten zijn opgenomen onder "overige".

	16S Datura	12S Datura	Combinatie 16S markers KWR	Doelsoort KWR (R7, R8 en/of O2)
Soorten				
adderzeenaald	+	+		
afrikaanse meerval			+	
alver	+	v	+	+
Amerikaanse bruine dwergmeerval	+	+	+	
Amerikaanse dikkopelrits	+	+		
Amerikaanse hondsviis	+	+	+	
Amerikaanse paling	+			
Amerikaanse zwarte dwergmeerval	+	+		
amoergrondel	+	+		
ansjovis	+	+	+	+
Atlantische horsmakreel	+	+	+	
Atlantische steur	+	+	+	+
Atlantische zalm	+	+	+	+
Australische ansjovis	+			
Aziatische modderkruiper	+	+		
baars	+	v	+	
bandeng	+	+		
barbeel	+	+	+	+
beek-/rivierprik	+	+	+	+
beek/zeeforel	+	+	+	+
beekdonderpad	+	+	+	+
bermpje	+	+	+	
bittervoorn	+	+	+	+
blankvoorn	+	+	+	
blauwband	+	+	+	
blauwe haai	+	+		
blauwe wijting	+	+		
blauwkeeltje	+	+		
blauwintonijn	+	+		
blonde rog	+	v		
bokvis	+	+		
bonito	+	+		
bot	v	v	+	+
botervis	+	+	+	+
braam	+	+		
brakwatergrondel	+	+	+	+
brasem	+	+	+	
bronforel	+	+		
Chumzalm	+			
Congeraal	+			
Cuckoo wrasse	+	+		
dikkopje	+	+	+	+
diklipharder	+	+	+	+
Donaubrasem	+	+	+	
Donauzalm	+	+		



	16S Datura	12S Datura	Combinatie 16S markers KWR	Doelsoort KWR (R7,R8 en/of O2)
Soorten				
doornhaai	+	+		
driedoornige stekelbaars	+	+	+	+
driedradige meun	+	+		
dunlipharder	+	V	+	+
dwergbolk	+	+	+	
dwertong	+	+		
<i>Economidichthys pygmaeus</i>	+	+		
elft	+	+	+	+
elrits	+	+	+	
Europese meerval	+	+	+	
evervis	+	+		
fint	+	+	+	+
forelbaars	+	+		
Franse tong	+	+		
gaffelkabeljauw	+	+		
geep	+	+	+	+
gehoorde slijmvis	+	+		
gemarmerde sidderrog	+	+		
gestippelde alver	+		+	
gestreepte bokvis	+			
gestreepte poon	+			
gevlekte gladde haai	+	+		
gevlekte lipvis	+	+		
gevlekte pitvis	+			
gevlekte rog	+	V		
gewone pijlstaartrog	+			+
gewone zeebarbeel	+	+		
gewone zeebrasem	+			
giebel	+	V		
gladde haai	+	+		
glasgrondel	+	+	+	+
golfrog	+	V		
goudbrasem	+			
goudharder	+	V	+	+
goudvis	+	V		
graskarper	+	+	+	
grauwe poon/Engelse poon	+	+	+	
griet	+	+	+	+
groene zeedonderpad	+	V	+	
Groenlandse haai	+	+		
grootkopkarper	+	V	+	
grootoogrog	+	+		
grote modderkruiper	+	+	+	+
grote pieterman	+	+		
grote zeenaald	+	+	+	+
gup	+	+	+	
haring	+	+	+	+
haringhaai	+	+		
harnasmannetje	+	+	+	+
heek	+	+		
heilbot	+	+		
hondshaai	+	+		
Japanse paling	+			
kabeljauw	+	+	+	+
karper	+	+	+	
kathaaï	+			



	16S Datura	12S Datura	Combinatie 16S markers KWR	Doelsoort KWR (R7,R8 en/of O2)
Soorten				
Kesslers grondel	+	+	+	
kleine koornaarvis	+	+	+	
kleine marene	+	V		
kleine modderkruiper	+	+	+	+
kleine modderkruiper - hybride	+	+		+
kleine pieterman	+	+	+	
kleine slakdolf	+	V		
kleine zeenaald	+	+	+	+
kleinoogrog	+	V		
kleurige grondel	+	+		
kiplipvis	+	+		
kolblei	+	V	+	
koningsvis	+	+		
koolvis	+	V		
koornaarvis	+	+	+	
kopvoorn	+	+	+	+
kortsnuitzeepaardje	+	+		
kroeskarper	+	+	+	+
kwabaal	+	+	+	+
lange schar	+	V		
leng	+	+		
lichtend sprotje	+			
lodde	+	+		
lozano's grondel	+		+	
maanvis	+	+		
makreel	+	+	+	
makreelgeep	+			
marm grondel	+	+	+	
mul	+	+		
naakte grondel	+	+		
naakthalsgrondel	+	+		
nijlbaars	+	+		
Oceanic puffer	+	+		
Pacifische heek	+			
Pacifische horsmakreel	+			
paling	+	+	+	+
Pangasius	+	+		
<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	+	+		
Pemecou sea catfish	+	+		
Peruaanse ansjovis	+			
pitvis	+		+	
pollak	+	V		
Pomatoschistus norvegicus	+	+		
Pontische stroomgrondel	+	+	+	
pos	+	+	+	
puitaal	+	+	+	+
regenboogforel	+	+		
reuzenhaai	+	+		
riemvis	+	+		
rietvoorn	+	+	+	+
rivierdonderpad	+	+	+	+
riviergrondel	+	+	+	+
rode poot	+		+	+
rode zalm	+	V		
rode zeebrasem	+			



	16S Datura	12S Datura	Combinatie 16S markers KWR	Doelsoort KWR (R7,R8 en/of O2)
Soorten				
roofblei	+		+	
russische steur	+	V	+	
ruwe haai	+			
sardien	+		+	
schar	+		+	+
scharretong	+	+		
schelvis	+	+		
schol	V	V	+	+
schurftvis	+	+	+	
<i>Sebastes schlegelii</i>	+	+		
serpeling	+	+	+	+
siberische steur	+	V	+	+
slakdolf	+	V	+	+
slijmvis	+	+		
smelt	V	+	+	
sneep	+	+	+	+
snipvis	+	+		
snoek	+	+	+	+
snoekbaars	+	V	+	
snotolf	+	+	+	+
Spaanse makreel	+	+		
spiering	+	+	+	+
sprot	+	V	+	+
steenbolk	+	+	+	+
stekelrog	+	V		
sterlet	+	+	+	
sterrog	+	+		
<i>Symphodus bailloni</i>	+	+		
<i>Symphodus melops</i>	+	+		
tarbot	+	+	+	+
tiendoornige stekelbaars	+	+	+	
tilapia	+	+		
tong	+	+	+	+
tongschar	+		+	
<i>Triglops murrayi</i>	+			
trompetterzeenaald	+	+		+
tweevlekgrondel	+	+	+	
valse doornhaai	+	+		
vetje	+	+	+	+
vierdradige meun	+	+		
vijfdradige meun	+	+	+	+
vlagzalm	+	+	+	
vleet	+	V		
vorskwab	+	+		+
voshaai	+	+		
wijting	+	V	+	+
winde	+	+	+	+
witvingrondel	+	+	+	
zandspiering	+	V	+	+
zebravis	+	+		
zeebaars	+	+	+	+
zeebrasem	+	+		
zeedonderpad	+	V	+	+
zeeduivel	+	+		
zeeengel	+	+		



	16S Datura	12S Datura	Combinatie 16S markers KWR	Doelsoort KWR (R7,R8 en/of O2)
Soorten				
zeekarper	+			
zeelt	+	+	+	+
zeeprik	+	+	+	+
zeestekelbaars	+	+		+
zeewolf	+	+		
zilverkarper	+	v	+	
zonnebaars	+	+	+	
zonnevis	+	+		
zwaardvis	+	+		
zwartbekgrondel	+	+	+	
zwarte grondel	+	+		
zwarte vis	+	+		
zwartooglipvis	+			
overig				
alver/gestippelde alver	nvt	+	nvt	+
baars/snoekbaars	nvt	+	nvt	
blauwneus of kolblei	+	+		
blonde rog/ gevlekte rog	nvt	+	nvt	
bot/schol	+	+	nvt	+
dunlipharder/goudharder	nvt	+	nvt	+
golfrog/stekelrog/kleinoogrog/leet	nvt	+	nvt	
groene zeedonderpad/gewone zeedonderpad	nvt	+	nvt	+
giebel/goudvis	nvt	+	nvt	
goudharder/dunlipharder	nvt	+	nvt	
grootkopkarper/zilverkarper	nvt	+	nvt	
houting complex	+	+	+	+
kleine roodbaars/roodbaars	+	+	nvt	
kleine slakdolf/ slakdolf	nvt	+	nvt	+
pollak/wijting/koolvis	nvt	+	nvt	
rode zalm/roze zalm	nvt	+	nvt	
russische steur/Atlantische steur	nvt	+	nvt	
schar/lange schar	nvt	+	nvt	+
smelt/zandspriering	+	nvt	nvt	+
siberische steur/stersteur	nvt	+	nvt	
sprot/haring	nvt	+	nvt	+
stersteur/sterlet	nvt	+	nvt	
aantal soorten	225	182	108	
aantal doelsoorten	66	63	61	66
aantal overige	4	19	1	



Bijlage III Vergelijk laboratoria

Overzicht verschil/overeenkomst tussen laboratoria a.d.h.v. 30 duplomonsters Lijst met soorten die zijn gedetecteerd in de 30 duplo monsters die zowel door Datura Molecular Solutions als door KWR zijn geanalyseerd. Weergegeven zijn soorten die overlappen of uniek zijn voor de twee laboratoria. Doelsoorten zijn aangegeven met een "+" en het totaal aantal soorten per categorie is aangegeven onderaan de lijst met soorten. *niet in ref database Datura, **niet in ref database KWR.

	Overlappende soorten	Unieke soorten DATURA	Unieke soorten KWR	Doelsoorten
alver	x			+
ansjovis	x			+
Atlantische horsmakreel			x	
Atlantische zalm	x			+
baars	x			
barbeel	x			+
beek-/rivierprik	x			+
beek/zeeforel	x			+
beekdonderpad		x		+
bermpje			x	
bittervoorn	x			+
blankvoorn	x			
blauwband			x	
bot			x	+
botervis	x			+
brakwatergrondel	x			+
brasem	x			
dikkopje	x			+
diklipharder	x			+
driedoornige stekelbaars	x			+
dunlipharder	x			+
elft			x	+
elrits	x			
Europese meerval			x	
Europese zeebaars	x			+
fint		x		+
gehoorde slijmvis**		x		
gestippelde alver	x			
gewone slijmvis**		x		
gewone zeedonderpad		x		+
giebel			x	
goudharder		x		+
goudvis		x		
graskarper			x	
grauwe poon			x	
haring	x			+
harnasmannetje		x		+
houting complex	x			+
kabeljauw	x			+
karper	x			



	Overlappende soorten	Unieke soorten DATURA	Unieke soorten KWR	Doelsoorten
Kesslers grondel	x			
kleine modderkruiper	x			+
kolblei	x			
koornaarvis		x		
kopvoorn	x			+
kroeskarper			x	+
kwabaal			x	+
marm grondel			x	
paling	x			+
Pontische stroomgrondel	x			
pos	x			
regenboogforel	x			
rietvoorn	x			+
rivierdonderpad		x		+
riviergrondel	x			+
rode poot			x	+
roofblei	x			
russische steur*			x	
schar	x			+
schol			x	+
Serpeling	x			+
siberische steur			x	
sneep	x			+
snoek	x			+
snoekbaars	x			
spiering	x			+
sprot	x			+
steenbolk	x			+
tarbot			x	+
tiendoornige stekelbaars	x			
tong	x			+
tongschar			x	
tweevlekgrondel				
wijting	x			+
winde	x			+
witvinggrondel	x			
zeeprik			x	+
zonnebaars			x	
zwartbekgrondel	x			
totaal	48	10	20	46



Bijlage IV Duplo monsters

Lijst met soorten die zijn gedetecteerd in de 30 duplo monsters die zowel door Datura Molecular Solutions als door KWR zijn geanalyseerd. Hierin is een vergelijking gemaakt tussen de “**conservatieve**” filtering die is gebruikt in deze rapportage en een minder conservatieve “**progressieve**” filtering vergelijkbaar met de filtering door KWR. Doelsoorten zijn aangegeven met een “+” en het totaal aantal soorten en doelsoorten is aangegeven onderaan de lijst. Oranje gelabelde soorten zijn bij progressieve filtering nieuw gedetecteerde soorten.

Soort	Datura		KWR	KRW doelsoort
	conservatieve filtering	progressieve filtering		
Alver	x	x	x	+
Ansjovis	x	x	x	+
Atlantische horsmakreel			x	+
Atlantische zalm	x	x	x	+
Baars	x	x	x	
Barbeel	x	x	x	+
Beek-/rivierprik	x	x	x	+
Beek/zeeforel	x	x	x	+
Beekdonderpad	x	x		
Bermpje		x	x	
Bittervoorn	x	x	x	+
Blankvoorn	x	x	x	
Blauwband			x	
Blonde grondel		x		
Bot	nvt	nvt	x	+
Botervis	x	x	x	+
Brakwatergrondel	x	x	x	+
Brasem	x	x	x	
Dikkopje	x	x	x	+
Diklipharder	x	x	x	+
Driedoornige stekelbaars	x	x	x	+
Dunlipharder	x	x	x	+
Elft			x	+
Elrits	x	x	x	
Europese meerval		x	x	
Europese zeebaars	x	x	x	+
Fint	x	x		+
Gehoornde slijmvis	x	x		
Gestippelde alver	x	x	x	
Gewone slijmvis	x	x		
Gewone zeedonderpad	x	x		+
Giebel			x	
Goudharder	x	x		
Goudvis	x	x		
Graskarper		x	x	
Grauwe poon			x	
Haring	x	x	x	+
Harnasmannetje	x	x		+
Houting - complex	x	x	x	+
Kabeljauw	x	x	x	+
Karper	x	x	x	
Kesslers grondel	x	x	x	
Kleine modderkruiper	x	x	x	+



Soort	Datura		KWR	KRW doelsoort
	conservatieve filtering	progressieve filtering		
Kleine modderkruiper - hybride		x		+
Kolblei	x	x	x	
Koornaarvis	x	x		
Kopvoorn	x	x	x	+
Kroeskarper		x	x	
Kwabaal			x	+
Makreel		x		
Marm grondel		x	x	
Paling	x	x	x	+
Pontische stroomgrondel	x	x	x	
Pos	x	x	x	
Regenboogforel	x	x	x	
Rietvoorn	x		x	+
Rivierdonderpad	x	x		+
Riviergrondel	x	x	x	+
Rode poon			x	+
Roofblei	x	x	x	
Ruisvoorn		x		
Russische steur			x	
Schar	x	x	x	+
Schol	nvt	nvt	x	+
Serpeling	x	x	x	+
Siberische steur			x	
Smelt		x		
Sneep	x	x	x	+
Snoek	x	x	x	+
Snoekbaars	x	x	x	
Snotolf		x		+
Spiering	x	x	x	+
Sprot	x	x	x	+
Steenbolk	x	x	x	+
Tarbot			x	+
Tiendornige stekelbaars	x	x	x	
Tilapia		x		
Tong	x	x	x	+
Tongschar			x	
Tweevlekgrondel	x			
Vlagzalm		x		
Wijting	x	x	x	+
Winde	x	x	x	+
Witvingrondel	x	x	x	
Zeelt		x		+
Zeeprik			x	+
Zilverkarper		x		
Zonnebaars		x	x	
Zwartbekgrondel	x	x	x	
aantal soorten	59	73	68	
aantal doelsoorten	39	41	41	51



Bijlage V Discrepantie soorten eDNA traditionele vangmethodieken

Discrepantie in aangetroffen soorten middels eDNA (16S in 2018) en traditionele vangmethodieken (actief-passief in periode 2012-2016) in de Haringvliet, Nieuwe Waterweg en de Rijn. Er wordt een toelichting op de waarschijnlijkheid van aanwezigheid in 2018 gegeven.

Haringvliet			
Vissoorten	16S	actief-passief	Toelichting
Atlantische zalm	+	+	Soort wordt veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft.
Barbeel	+	-	Soort van stromende beken en rivieren.
Beekdonderpad	+	-	Soort van stromende beken en rivieren. Zeer beperkte verspreiding in Nederland.
Bittervoorn	+	-	Soort van stilstaande tot zwak stromende plantenrijke wateren. Is bekend uit het Haringvliet-Oost. Mogelijk door zoute invloeden niet in Haringvliet-West.
Dunlipharder	+	-	Soort kan bij monitoring verward zijn met diklipharder.
Kleine modderkruiper	+	-	Soort van stilstaande tot zwak stromende plantenrijke wateren. Is nauwelijks bekend uit het Haringvliet. Mogelijk afwezig door zoute invloeden in Haringvliet-West.
Rietvoorn	+	-	Soort van stilstaande tot zwak stromende plantenrijke wateren. Is nauwelijks bekend uit het Haringvliet. Mogelijk afwezig door zoute invloeden in Haringvliet-West.
Roofblei	+	-	Soort niet aangetroffen binnen actieve en passieve vismonitoring, echter wel bekend uit het Haringvliet.
Schar	+	-	eDNA waarschijnlijk binnengekomen via Haringvlietssluis en/of met schepen/visnetten via sluiscomplex Stellendam. Mogelijk sporadisch aanwezig.
Serpeling	+	-	Soort van stromende beken en rivieren.
Tiendornige stekelbaars	+	-	Soort van stilstaande tot zwak stromende plantenrijke wateren. Is nauwelijks bekend uit het Haringvliet. Mogelijk afwezig door zoute invloeden in Haringvliet-West.
Tong	+	-	eDNA waarschijnlijk binnengekomen via Haringvlietssluis en/of met schepen/visnetten via sluiscomplex Stellendam. Mogelijk sporadisch aanwezig.
Kesslers grondel	-	+	Aanwezigheid bekend.
Marm grondel	-	+	Aanwezigheid bekend.
Rivierdonderpad	-	+	Soort is de laatste jaren sterk achteruitgegaan door opkomst Ponto-Kaspische grondels. Aanwezigheid hooguit sporadisch.
Witvingrondel	-	+	Aanwezigheid bekend.
Zeeprick	-	+	Aanwezigheid bekend.



Nieuwe Waterweg			
Vissoorten	16S	actief-passief	Toelichting
Atlantische zalm	+	+	De soort wordt veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft.
Alver	+	-	Zoetwaterissoort.
Ansjovis	+	-	Soort is niet/nauwelijks bekend uit de Nieuwe Waterweg.
Barbeel	+	-	Zoetwaterissoort.
Beekdonderpad	+	-	Zoetwaterissoort.
Bittervoorn	+	-	Zoetwaterissoort.
Brakwatergrondel	+	-	Soort is niet/nauwelijks bekend uit de nieuwe Waterweg. Soort wordt verward met dikkopje. Dikkopje komt wel voor.
Donaubrasem	+	-	Zoetwaterissoort.
Europese sardien	+	-	Soort is niet bekend uit de Nieuwe Waterweg. Mogelijk door de inmenging van het zoete water.
Geep	+	-	Soort is niet/nauwelijks bekend uit de Nieuwe Waterweg. Mogelijk door de inmenging van het zoete water. Monitoring met boomkor is voor deze pelagische soort niet geschikt.
Gehoornde slijmvis	+	-	Soort leeft tussen stenen en rotsen. Mogelijk is de soort wel aanwezig. Met gebruikte methodiek kan niet tussen stenen en rotsen gemonitord worden.
Gestippelde alver	+	-	Strikte zoetwatersoort.
Gewone slijmvis	+	-	Soort leeft tussen stenen en rotsen. Mogelijk is de soort wel aanwezig. Met gebruikte methodiek kan niet tussen stenen en rotsen gemonitord worden.
Goudharder	+	-	Soort is niet aangetroffen in de Nieuwe Waterweg en is van de inheemse harders het minst tolerant voor zoet water.
Graskarper	+	-	Zoetwaterissoort.
Karper	+	-	Zoetwaterissoort.
Kleine modderkruiper	+	-	Zoetwaterissoort.
Kopvoorn	+	-	Zoetwaterissoort.
Regenboogforel	+	-	Zoetwaterissoort.
Rietvoorn	+	-	Zoetwaterissoort.
Riviergrondel	+	-	Zoetwaterissoort.
Snoek	+	-	Zoetwaterissoort.
Tiendornige stekelbaars	+	-	Zoetwaterissoort.
Vetje	+	-	Zoetwaterissoort.
Zwaardvis	+	-	Soort is zeer zeldzaam aan de Nederlandse kust.
Zwarte grondel	+	-	Soort leeft tussen stenen en rotsen. Mogelijk is de soort wel aanwezig. Met gebruikte methodiek kan niet tussen stenen en rotsen gemonitord worden.
Hondshaai	-	+	Zoutwaterissoort.
Kleine pieterman	-	+	Zoutwaterissoort.
Pitvis	-	+	Zoutwaterissoort.
Rode poon	-	+	Zoutwaterissoort.
Tongschar	-	+	Zoutwaterissoort.
Tweevlekgrondel	-	+	Zoutwaterissoort.
Witvingrondel	-	+	Zoetwaterissoort. Fysieke aanwezigheid aangetoond, zal sporadisch aanwezig zijn en geen populatie vormen.
Zeeprrik	-	+	Soort gebruikt de Nieuwe Waterweg als doortrek route van en naar zee gedurende bepaalde perioden van het jaar



Rijn			
Vissoorten	16S	actief-passief	Toelichting
Atlantische zalm	+	+	De soort wordt veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft
Ansjovis	+	-	De soort wordt gegeten. Onduidelijk is wat de exacte oorsprong (vervuilingsbron) is van het eDNA.
Beekdonderpad	+	-	Soort van stromende beken en rivieren stroomopwaarts van de Nederlandse Rijn. Mogelijk hooguit sporadisch aanwezig
Elft	+	-	Soort is zeer zeldzaam, maar wordt bovenstrooms van de Nederlandse Rijn geherintroduceerd en migreert over lange afstanden stroomop- en afwaarts.
Elrits	+	-	Soort van stromende beken en rivieren stroomopwaarts van de Nederlandse Rijn. Mogelijk hooguit sporadisch aanwezig
Gestippelde alver	+	-	Soort van stromende beken en rivieren stroomopwaarts van de Nederlandse Rijn. Een exemplaar is recent wel in de Nederlandse Rijn aangetroffen. Aanwezigheid hooguit sporadisch.
Haring	+	-	De soort wordt veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft
Regenboogforel	+	-	De soort wordt veel uitgezet voor de sportvisserij (forellenvijvers). Daarnaast wordt de soort veel gegeten. Onduidelijk is wat de mate van vervuiling door consumptie betreft.
Rivierdonderpad	+	-	De soort is altijd zeldzaam geweest in de Rijn. De opkomst van Ponto-Kaspische grondels heeft de soort in andere delen van Nederland al doen verdwijnen.
Witvingrondel	+	-	Op basis van visgegevens uit onderzoeken in 2018 en 2019 stroomafwaarts van het waterlichaam, kan gesteld worden dat het zeer aannemelijk is dat witvingrondel in de Rijn aanwezig is.
Zeeprik	+	-	Soort gebruikt de Rijn als doortrek route van en naar zee gedurende bepaalde perioden van het jaar.
Rietvoorn	-	+	Algemene zoetwatervissoort.
Snoek	-	+	Algemene zoetwatervissoort.



Bijlage VI Effect van bio-informatica filters

Effect van bio-informatica filters op de data. Monsters 20284 als voorbeeld. Dit monster is verzameld verzameld op 27 maart 2018 aan het oppervlak van raai 3.

1. ongefilterde data
2. obclean: internal en singletons verwijderd
3. alleen OTU's behouden waarvan 50 of meer reads aanwezig waren.
4. progressief gefilterd: contaminaties verwijderd (X(16S)=30, X(12S)=25) en soorten die met minder dan 0,015% voorkomen zijn verwijderd
5. conservatief gefilterd: contaminaties verwijderd (X(16S)=1, X(12S)=1) en soorten die met minder dan 0,08% voorkomen zijn verwijderd

soort	1	2	3	4	5	KWR
alver	0,003747361	0,003663595	0,003664	0,002104	0	
Atlantische horsmakreel	0	0	0	0	0	X
Atlantische zalm	1,28E-05	0	0	0	0	X
baars	0,005202915	0,005224088	0,005224	0,005441	0	X
baars/snoekbaars	0,009015361	0,00905205	0,009052	0	0	
barbeel	0,037369077	0,037521152	0,037521	0,039076	0,03204	X
beek/rivierprik	0,001218878	0,001181262	0,001181	0,00123	0	X
beek/zeeforel	0,000339235	0,000141593	0,000142	0	0	X
beekdonderpad	1,18E-05	0	0	0	0	
bermpje	2,07E-05	0	0	0	0	X
bittervoorn	0,000222869	0,00012377	0,000124	0	0	
blankvoorn	0,022324409	0,02241526	0,022415	0,018398	0	
blankvoorn	0,016096887	0,016162394	0,016162	0,016832	0	
bot/schol	0,000356985	0	0	0	0	
botervis	0,000109462	0	0	0	0	
brakwatergrondel	1,18E-05	0	0	0	0	
brasem	0,045374623	0,045559277	0,045559	0,029679	0	X
dikkopje	7,20E-05	0	0	0	0	X
donderpad onbekend	0,001790844	0,001798132	0,001798	0,001873	0	
dunlipharder	8,28E-05	0	0	0	0	
elrist	0,000578869	0,000581224	0,000581	0,000605	0	
gehoorde slijmvis	2,96E-05	0	0	0	0	
gestippelde alver	0,002437757	0,002213999	0,002214	0,002306	0,00301	
goudharder/dunlipharder	0,000181451	0	0	0	0	
goudvis	0,000424043	0,000425769	0,000426	0,000443	0	
goudvis/giebel	0,000704109	0,000706975	0,000707	0,000736	0	X
graskarper	6,90E-06	0	0	0	0	
griet	4,93E-06	0	0	0	0	
grauwe poon	0	0	0	0	0	X
groene zeedonderpad	1,38E-05	0	0	0	0	
groene/gewone zeedonder	1,18E-05	0	0	0	0	
haring	1,18E-05	0	0	0	0	X
haring/sprot	8,48E-05	0	0	0	0	
kabeljauw	0,000129185	0	0	0	0	
karper	0,004985962	0,00498645	0,004986	0,005193	0	X
kesslers grondel	0,025686186	0,025790718	0,025791	0,02686	0	X
kleine modderkruiper	0,000401362	0,000208924	0,000209	0,000218	0	
kleine modderkruiper hybr	3,75E-05	0	0	0	0	
kolblei	0,002489037	0,002499166	0,002499	0,002603	0	
kolblei/blauwneus	0,001751398	0,001758526	0,001759	0,001831	0	
kopvoorn	0,003110309	0,003122967	0,003123	0,003252	0	X
kroeskarper	0	0	0	0	0	X



soort	1	2	3	4	5	KWR
leng	9,86E-06	0	0	0	0	
marmergroundel	0,000199202	0	0	0	0	
meerval	0,00048124	0,000483198	0,000483	0	0	
paling	0,005032311	0,004881493	0,004881	0,002514	0	X
pontische stroomgrondel	6,90E-06	0	0	0	0	
pos	0,001001926	0,001006003	0,001006	0	0	
regenboogforel	0,001936794	0,001813975	0,001814	0,001889	0,00173	
rivierdonderpad	0,000497018	0,000499041	0,000499	0,00052	0	
riviergrondel	0,001621227	0,001627824	0,001628	0,001695	0,001555	
rode poot	0	0	0	0	0	X
roofblei	0,168506982	0,169192732	0,169193	0,176205	0,230033	X
schar	0,000280066	0	0	0	0	X
serpeling	0,002212915	0,002221921	0,002222	0,002314	0,002858	
smelt	0,000211036	0	0	0	0	
sneep	0,004516556	0,004534936	0,004535	0,004723	0,005281	X
snoek	0,000711012	0,000641624	0,000642	0,000668	0	X
snoekbaars	0,002571873	0,002582339	0,002582	0	0	X
snotolf	0,000273163	0,000328733	0,000329	0,000342	0	
spiering	3,35E-05	0	0	0	0	
sprot	7,69E-05	0	0	0	0	
steenbolk	4,93E-06	0	0	0	0	
tarbot	0	0	0	0	0	X
tiendoornige stekelbaars	0,000856962	0,00086045	0,00086	0,000896	0	
tiendoornige stekelbaars	0,000147922	0	0	0	0	
tong	0,000427002	0,000362399	0,000362	0	0	X
tongschar	0	0	0	0	0	X
vetje	2,47E-05	0	0	0	0	
wijting	2,35E-04	0,00E+00	0	0	0	X
winde	0,560886231	0,563168792	0,563169	0,586509	0,723493	X
witvingrondel	0,000668608	0,000558451	0,000558	0,000582	0	X
zeebaars	0,000164687	0	0	0	0	X
zeelt	0,000302747	0,000216845	0,000217	0,000226	0	
zonnebaars	0,00012031	0,0001208	0,000121	0	0	
zwartbekgrondel	0,059518937	0,059761153	0,059761	0,062238	0	X



Bijlage VII Concept RWS-V

Inhoud

- 1 Doel en toepassingsgebied
- 2 Termen en definities
- 3 Hulpmiddelen en personeel
- 4 Werkwijze

1 Doel en toepassingsgebied

Dit RWS-V beschrijft de bemonsteringsmethode voor eDNA metabarcoding van vissoorten in de rijkswateren. Tevens wordt de behandeling van de eDNA monsters beschreven in de laboratoriumfase en worden handvaten gegeven voor de bio-informatica analyse die uiteindelijk resulteert in een soortenlijst.

Op basis van het huidige onderzoek ("Effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring rijkswateren") is het voorliggende concept RWS-V opgesteld, waarin minimale eisen en aanbevelingen zijn opgenomen. Op basis van toekomstige monitoringsresultaten kunnen de gemaakte keuzes geëvalueerd en zo nodig gewijzigd worden, waarna ze kunnen worden vastgelegd in een definitief RWS-V.

Voor vereisten aan algemene principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek kan worden verwezen naar de gelijknamige Nederlandse Praktijkrichtlijn NPR 7394 (2016). In Europees verband wordt er ook al gewerkt aan afstemming en standaardisatie van eDNA toepassingen, binnen de COST-actie DNAquanet.

Het onderliggende onderzoek van deze RWS-V biedt nog onvoldoende handvaten om een definitief RWS-V op te stellen. Een aantal zaken dient nader te worden onderzocht alvorens uiteindelijk te bepalen hoe deze in het RWS-V opgenomen gaan worden.

2 Termen en definities

eDNA metabarcoding	Techniek waarbij eDNA van meerdere soorten uit één monster wordt gekarakteriseerd.
Veldcontrole	Betreft een (negatieve) controle monster waarbij DNA-vrij water gefilterd is onder dezelfde omstandigheden als de monsters die worden genomen in het kader van het onderzoek.
Bemonsteringshabitat	Betreft het deel van de waterkolom dat wordt bemonsterd.
Bemonsteringslocatie	Geografische aanduiding van een punt waar een monster genomen wordt.
Waterlichaam	Betreft een bepaald deel van een rijkswater dat binnen de KRW als waterlichaam is gedefinieerd.
Mock-community	Is een artificieel samengesteld DNA-monster met daarin bekende hoeveelheden DNA van een bekend aantal zoet- en zoutwatervissoorten en is een maat voor het voorkomen van vals negatieve detecties.



3 Hulpmiddelen en personeel

3.1 Hulpmiddelen

Onderstaande hulpmiddelen zijn minimaal nodig om de werkzaamheden te kunnen uitvoeren:

- Vaartuig: geschikt voor grote rijkswateren en uitgerust conform vigerende eisen. Vaartuig dient bij voorkeur niet gebruikt te zijn voor biologische monitoring van vis.
- GPS (nauwkeurigheid 1 – 5 m).
- eDNA monsterkits (samengesteld in het laboratorium).
- Persoonlijke Beschermingsmiddelen.

3.2 Personeel

Uitvoerend personeel dient juist geïnstrueerd te zijn en ervaring te hebben met steriel werken. Ook dienen zij bewust te zijn van mogelijke besmettingsbronnen en factoren die de kwaliteit van de (e)DNA-monsters kunnen beïnvloeden. Kleding van personeel dient niet gedragen te zijn bij de uitvoering van biologische monitoring van vis. Personeel dient te beschikken over vaarbewijs 1 en 2, marifoonbewijs en VCA-VOL.

4 Werkwijze

4.1 eDNA bemonstering rijkswateren

4.1.1 Monstername

Monstername dient te voldoen aan minimaal de volgende eisen:

- **Steriele monstername kit:** de bemonsteringskit dient samengesteld te zijn volgens de minimale eisen (zie 4.3.2) en pas geopend te worden in het veld.
- **Veldcontrole:** tijdens iedere velddag en/of per waterlichaam (in het geval er meer dan één waterlichaam per velddag wordt bemonsterd) dient minimaal 1 negatief controlemonster (veldcontrole) in het onderzoek te worden meegenomen om mogelijke contaminatie in beeld te brengen.
- **Filtratie:** filtratie van de monsters in het veld wordt uitgevoerd met een gesloten filtercapsule (zie aanbevelingen hieronder).

Aanbevelingen monstername:

- **Monstervolume:** minimaal 1 liter. In de bestudeerde waterlichamen leverde een watermonster van 1L per monsterpunt over het algemeen voldoende eDNA op voor vervolganalyse.
- **Type filtercapsule:** Het aantal stappen van monsterverwerking dient zoveel mogelijk beperkt te worden om contaminatie te reduceren. Het is aan te raden om met een gesloten filtersysteem te werken. Met behulp van een vacuümpomp wordt het water hierbij door het filter getrokken. Verkend kan worden of het bemonsteren van een groot volume (~40 liter) middels een cross-flow resulteert in een hogere detectiekans. Een veel gebruikte cross-flow filter is de Envirochek HV Sampling Capsule.



- **Conservering van DNA:** Aangezien het toevoegen van een conserveringsvloeistof of het overbrengen van het filter naar een eppendorf reactievaatje een extra stap is waarbij contaminatie kan ontstaan, is het aan te raden om met een alternatief systeem te werken: bij een nieuw type filtercapsule wordt het DNA geconserveerd doordat het membraan met daarop het eDNA uitdroogt doordat het vocht opgenomen wordt door de behuizing van het filter.

4.1.2 Bemonsteringsstrategie

- **Bemonsteringshabitat:** bemonsteren aan de oppervlakte van het waterlichaam is effectiever dan bemonstering nabij de bodem: het is kostenefficiënter en heeft minder risico op contaminatie. De bemonstering kan plaats vinden vanaf de oever mits de representatieve bemonsteringslocatie goed bereikbaar is. Bemonstering midden op de rivier levert geen completere soortenlijst. In veel gevallen zal het echter tijdsbesparing opleveren om met een boot vanaf het water te bemonsteren omdat locaties met de boot eenvoudiger te bereiken zijn.
- **Aantal monsters per waterlichaam:** bij de bemonstering van een waterlichaam zijn 15-25 monsters van 1 L voldoende om circa 90% van de aanwezige soorten te detecteren. Om tot een zo'n compleet mogelijk beeld van de soortenrijkdom te komen, moeten verschillende, ruimtelijk verspreide locaties worden bemonsterd (bv. midden op de hoofdgeul, oever met vegetatie, in een kribvak, in een haven/ bij monding van een haven, oever met stortstenen, enz.).
- **Periode van bemonsteren:** diverse doelsoorten zijn niet jaarrond aanwezig. Voor een volledig soortbeeld dient tenminste in het voorjaar (maart-mei) en het najaar (september-november) een bemonstering plaats te vinden.

4.2 Monsterbehandeling

De monsterbehandeling is afhankelijk van het type filter dat wordt gebruikt. Opdrachtnemer dient aan te kunnen tonen dat de gehanteerde monsterbehandeling resulteert in een representatieve soortenlijst.

Aanbevelingen monsterbehandeling:

- Watermonsters dienen bij voorkeur direct na monsternamen gefiltreerd te worden om verdere afbraak van eDNA te minimaliseren. Indien filtratie niet direct mogelijk is, bewaar de watermonsters in een koelkast met een temperatuur van 4 ± 2 °C of onder gelijkwaardige condities (b.v. koelbox) en filtreer ze op de dag van monsternamen.
- Het eDNA dat als residu in het filter achterblijft wordt geconserveerd in een DNA-conserveringsbuffer of alternatieve methode (afhankelijk van het type filter dat wordt gebruikt). Opslag van monsters is afhankelijk van de conserveringsmethode die wordt gebruikt.
- Monsters worden zo snel mogelijk naar het laboratorium getransporteerd voor verdere analyse.

4.3 Laboratoriumanalyse

4.3.1 Laboratoriumeisen



Het laboratorium dient aantoonbaar ingericht te zijn voor het uitvoeren van DNA onderzoek en dient aannemelijk te maken dat het ingericht is om contaminatie te voorkomen. De NPR 7394 bevat de nodige minimale eisen voor de inrichting van het uitvoerend laboratorium.

In het ideale scenario is het laboratorium als volgt ingericht en worden de volgende procedures gehanteerd:

- **Gescheiden labs:** eDNA analyses worden uitgevoerd middels een zeer gevoelige PCR. Nadeel van deze gevoeligheid is dat minieme DNA-vervuilingen kunnen zorgen voor onbetrouwbare resultaten:
 - DNA-vrij laboratorium (laboratoriumruimte 1). De monsterkits, buffers en PCR-reagentia dienen te worden voorbereid in een ruimte waarin geen DNA-monsters verwerkt worden.
 - eDNA-laboratorium (laboratoriumruimte 2). De eDNA monsters dienen geëxtraheerd te worden in ruimtes waarin gaan ander type DNA-monsters geëxtraheerd worden, of geëxtraheerd zijn. Dit voorkomt contaminaties met DNA-bronnen van hoge concentratie.
 - DNA-laboratorium (laboratoriumruimte 3). In deze ruimte vinden weefseextracties plaats voor het opbouwen van referentie en ten behoeve van het samenstellen van een mock-community.
 - PCR-laboratorium (laboratoriumruimte 4). Hier wordt de PCR en gel-elektroforese uitgevoerd en wordt DNA sequencing library voorbereid. Tevens vindt hier DNA sequencing plaats.
- **Luchtcirculatie:** in laboratorium 1 en 2 dient sprake te zijn van overdruk waardoor geen DNA-moleculen de ruimte binnen kunnen dringen. De lucht die naar binnen geblazen wordt dient gefilterd te zijn door middel van een HEPA-filter. In laboratorium 3 en 4 dient sprake te zijn van onderdruk middels afzuiging van de lucht. Zodoende worden hoge concentraties DNA die in deze ruimtes aanwezig zijn direct afgevoerd.
- **Eenrichtingsverkeer in de laboratoria:** materialen die gebruikt zijn in een laboratorium mogen niet verplaatst worden naar een laboratorium met een lager vervuilingniveau. Het is van belang dat analisten die werkzaam zijn in laboratorium 4 het laboratorium 1 en 2 niet betreden.
- **Kleding:** in laboratorium 1 en 2 dienen analisten steriele (wegwerp)laboratoriumjassen te dragen. Ook worden hier eventueel steriele mondkapjes, haarnetjes, schoenhoezen en handschoenen gedragen.

4.3.2 Samenstellen monsterkit met bemonsteringmaterialen

Bij het samenstellen van de monsterkit met bemonsteringmaterialen moet minimum voldaan worden aan de volgende eisen:

- **Laboratorium:** Samenstellen van monstermateriaal gebeurt in de DNA vrije ruimte (laboratorium 1)
- **Steriele materialen:** de monstermaterialen dienen steriel te zijn.
- **Codering:** het monstermateriaal wordt al in dit stadium van unieke codering voorzien zodat in het aantal handelingen in het veld beperkt blijft.

4.3.3 eDNA-extractie



Bij de uitvoering van eDNA-extracties moet minimum voldaan worden aan de volgende eis:

- **Laboratorium:** de eDNA extractie wordt uitgevoerd in een geschikte eDNA extractie ruimte binnen het moleculair laboratorium.
- **DNA opbrengst:** er moet voldoende DNA-materiaal worden geëxtraheerd voor de daaropvolgende analyses. DNA-opbrengst kan geoptimaliseerd worden door de keuze van extractie type (b.v. phenol-chloroform extractie) en door (e)DNA-extracties in duplo uit te voeren. Aansluitend kan een analyse op de DNA opbrengst uitgevoerd worden.

4.3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bij de uitvoering van PCR-analyses moet minimum voldaan worden aan de volgende eisen:

- **Laboratorium:** het samenstellen van de PCR-mixen wordt uitgevoerd in een DNA vrij laboratorium. De eDNA monsters worden toegevoegd in een daartoe ingerichte ruimte binnen het laboratorium. Hier wordt de PCR-plaat geseald en overgebracht naar het deel van het laboratorium waar de PCR uitgevoerd wordt.
- **Voorkomen van contaminatie van PCR-producten onderling:** de eDNA fragmenten dienen voorzien te worden van unieke indexen, zodat van ieder DNA-molecuul vastgesteld kan worden van welk monster deze afkomstig is. Belangrijk is dat elke index slechts eenmaal gebruikt wordt per uniek gelabelde DNA sequencing library. Zodoende kunnen contaminaties tussen PCR-producten voorkomen worden en kunnen crossing-over (een bepaald type PCR-fout) herkend worden.
- **Primerkeuze:** de PCR-primers dienen een kort fragment (maximaal 120 basepaar) van het mitochondriale, RNA-coderende genen (12S en/of 16S) te amplificeren. Andere mitochondriale genen als Cytochrome c oxidase subunit I (COI) en cytochrome B (CytB) zijn niet geschikt voor eDNA metabarcoding onderzoek. Eventueel kunnen meerdere primers in één multiplex PCR-reactie uitgevoerd worden.
- **PCR-mix:** de PCR dient uitgevoerd te worden middels een PCR-mix die aantoonbaar ongevoelig is voor inhibitie.
- **Replica's:** om aan de minimale kwaliteitseisen te kunnen voldoen, dient de PCR uitgevoerd te worden met 6 replica's per monster.
Om te voldoen aan de hoogste kwaliteitseisen zouden 12 replica's uitgevoerd moeten worden. Echter, aangezien dit gepaard gaat met hogere kosten, dient dit te worden afgewogen ten opzichte van de gestelde vraag en bijbehorende kwaliteitseisen.
- **PCR-omstandigheden:** er dient voldoende DNA-amplificatie gerealiseerd te worden met een minimale error rate (i.e. inbouwen van verkeerde nucleotide vergroot dus ook de kans dat een bepaalde vissoort kan worden verward met een andere soort wanneer de verschillen tussen beide soorten erg klein zijn). Aanbevolen wordt om max 35 cycli uit te voeren om error rate laag te houden. Meer cycli kan nodig zijn om de opbrengst van de PCR te vergroten, hierbij geldt een max van 50 cycli.
- **Voorkomen en reduceren van crossing-over:** Crossing-over introduceert onnodige fouten tijdens sequencing en kan voorkomen en/of gereduceerd worden door middel van:
 - Het indexeren van zowel de forward als reverse primer met een unieke index van minimaal 7 nucleotiden. Indien er crossing over van de primers ontstaat kan dit tijdens de bio-informatica stap opgehelderd worden



- Het toevoegen van een sequencing adapter aan de primers in de initiële PCR, waar de Illumina Nextera i5 en i7 index direct op aangrijpen.
- **Interne standaard:** een interne standaard dient gebruikt te worden om de mate van contaminatie in te schatten vergeleken met het eDNA dat aanwezig was in het watermonster. Hierbij wordt een bekende concentratie artificieel DNA toegevoegd aan iedere PCR-reactie van de eDNA samples. Op basis van deze interne standaard kan het absolute aantal moleculen berekend worden. Het aantal moleculen dat gemeten wordt in de negatieve lab- en veldcontroles wordt vervolgens afgetrokken van de gemeten concentraties eDNA in de monsters.
- **Controle van gewenste PCR-product:** middels gel-elektroforese dient vast te worden gesteld of de PCR geresulteerd heeft in het gewenste PCR-product. Hiervoor dienen de (6-12) PCR-replica's worden samengevoegd op basis van gelijk volume.

4.3.5 DNA sequencing library voorbereiding en sequencing

Bij de uitvoering van DNA sequencing moet minimum voldaan worden aan de volgende eisen:

- **Aantal reads per monster:** er dient naar gestreefd te worden een minimaal aantal van 300.000 visreads per monster te verkrijgen.

Aanbevelingen laboratoriumanalyse:

- **Concentratie meting:** De concentratie van de PCR-producten wordt gemeten middels een nanodrop of vergelijkbare apparatuur.
- **Poolen:** PCR-producten van maximaal 30 monsters worden samengevoegd in één pool. Van ieder monster wordt een gelijke concentratie DNA toegevoegd aan de pool. De indexen van de initiële PCR-producten binnen een pool dienen allen uniek te zijn zodat eventuele crossing-over herkend kan worden in de bio-informatica pipeline.
- **Tweede PCR:** door middel van een tweede PCR worden Illumina Nextera i5 en i7 indexen en adapter toegevoegd aan de pools van PCR-producten.
- **Samenvoegen van DNA libraries:** per Illumina sequencing run kunnen meerdere pools gecombineerd worden in één DNA sequencing library, mits de PCR-producten van elke pool voorzien zijn van unieke i5 en i7 indexen.
- **Aantal reads per monster:** Het totaal aantal DNA libraries per flowcell is afhankelijk van het type sequencer dat gebruikt wordt. Streven is om per marker van ieder monster 300.000 visreads te verkrijgen. Bij het vaststellen van het aantal monsters per flowcell dient rekening gehouden te worden met variatie tussen monsters, het verlies van reads die niet van voldoende kwaliteit zijn en reads die afkomstig zijn van niet-doelsoorten als zoogdieren en vogels.
- **Clean-up:** de DNA sequencing library wordt opgeschoond door middel van SPRI beads.
- **Sequencen:** het sequencen dient plaats te vinden middels Illumina sequencing, of een technologie dat vergelijkbare output kwaliteit genereert.
- **Mock-community:** om de efficiëntie van de PCR-stappen en de Next Generation Sequencing methode te controleren, wordt aanbevolen enkele monsters met een mock-community mee te nemen.



4.4 Bio-informatica

Opdrachtnemer dient aan te kunnen tonen dat de gehanteerde bio-informatica resulteert in een representatieve soortenlijst.

Aanbevelingen bio-informatica:

- **Eerste kwaliteit filtering:** de verwerking van de ruwe Illumina data en de multiplexen van de Nextera libraries kan uitgevoerd worden met behulp van de standaard Illumina Software.
- **Obitools:** middels het software package OBITools kan de data nader verwerkt worden.

4.5 Referentie database

- **Volledigheid referentie database:** alle doelsoorten dienen aanwezig te zijn in de referentie database.
- **Opstellen en uitbreiden referentie database:** Weefselextracties worden uitgevoerd in het DNA-laboratorium. PCR wordt voorbereid in een DNA vrij laboratorium. Weefselextracten worden aan de PCR-mix toegevoegd in het DNA-laboratorium. PCR, gel-elektroforese, clean-up en sequencen wordt uitgevoerd in het PCR-laboratorium. De toegekende soortnaam van het uitgaansmateriaal dient taxonomisch gevalideerd te worden.

5 Opzet vervolgonderzoek

Het onderzoek zoals beschreven in het rapport “Effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring rijkswateren” biedt nog onvoldoende handvaten om definitieve RWS-V op te stellen. De bovenstaande opzet kan worden toegepast in een vervolg monitoring. Na een jaar monitoring kan vervolgens geëvalueerd worden:

Resulteren de aanpassingen in het bemonsteringmethodiek en laboratoriumsituatie tot een beter onderscheid tussen ruis en daadwerkelijke detectie?

Resulteert het aantal monsters, de keuze van locaties, en de gekozen tijdstippen inderdaad in een representatieve soortenlijst?

Tenslotte kan op basis van de vervolgmonitoring vastgesteld worden hoe dataverwerking/bio-informatica eruit dient te zien en welke thresholds al dan niet gehanteerd dienen te worden.



Bureau Waardenburg bv

Onderzoek en advies voor ecologie en landschap

Postbus 365, 4100 AJ Culemborg

Telefoon 0345-512710, Fax 0345-519849

E-mail info@buwa.nl, www.buwa.nl