



Datura
molecular solutions in ecology

Vergelijking monstermethodes eDNA metabarcoding van vissen in de grote rivieren



Colofon

Titel	Vergelijking monstermethodes eDNA metabarcoding van vissen in de grote rivieren
Tekst, foto's en samenstelling	Kees van Bochove
In opdracht van	Rijkswaterstaat
Naam opdrachtgever	Stan Banach
Rapportnummer	RA20020
Datum oplevering rapport	07-08-2020
Aantal pagina's	16
Wijze van citeren	van Bochove, K. 2020 Concept rapportage: vergelijking monstermethodes eDNA metabarcoding van vissen in de grote rivieren. Datura Molecular Solutions, Wageningen.
Laboratorium analist	J. Rook, R. van Himbeek



Datura Molecular Solutions BV

Gevestigd te:

Agro Business Park 10
6708 PW Wageningen

0031(0)629455328

www.datura.nl

kees.vanbochove@datura.nl

Inhoudsopgave

1. Inleiding	4
2. Doel.....	4
3. Methode	5
3.1 Bemonstering	5
3.2 Laboratoriumanalyse	7
3.3 Bio-informatica	8
3.4. Data-analyse	10
4. Resultaten.....	10
4.1 Bemonstering	10
4.2 DNA extractie.....	11
4.2 DNA sequencing library preparation	11
4.3 DNA concentraties.....	11
4.4 Soortenrijkdom	12
4.5 Vervuilingen	13
4.6 Bijzondere waarnemingen.....	14
5. Discussie	15
5.1 Evaluatie filtermethodiek	15
5.2 Evaluatie maatregelen tegen vervuiling	16
5.3 Evaluatie aanpassing DNA library preparation	16
6. Conclusies	17
7. Literatuur	17

1. Inleiding

In 2018-2019 is een pilot uitgevoerd waarin de effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring van de rijkswateren onderzocht is door Datura, Bureau Waardenburg en KWR (Schutter et al., 2019). Dat project heeft inzicht gegeven in de toepasbaarheid van de methode. Op basis van ervaringen in dat project zijn aanbevelingen opgesteld voor toekomstig onderzoek met betrekking tot de bemonstering en de laboratoriumanalyse. In het huidige project zijn deze aanbevelingen doorgevoerd zodat op kleine schaal vastgesteld kon worden of deze aanpassingen leiden tot een verbeterd resultaat. Een belangrijke vraag die naar voren kwam, was of het bemonsteren van één liter water voldoende is, of dat het bemonsteren van een groter volume resulteert in een vollediger soortenlijst. De focus van dit onderzoek lag op het effect van het bemonsterde volume, in combinatie met twee verschillende extractie methodes, op de detectiekans van vissen.

2. Doel

Primaire doel van dit project is om een update te maken van de RWS-V, waarmee in de toekomst op grote schaal eDNA metabarcoding onderzoek in de grote rivieren uitgevoerd kan worden.

Hoofdvraag is of het vergroten van het monstervolume leidt tot betere detectiekansen. Op basis hiervan kan besloten worden welke monstermethode het meest geschikt is voor eDNA monitoring in de grote rijkswateren. De efficiëntie van de monstermethode is nauw verweven met de extractie methode in het laboratorium. Daarom wordt ook de efficiëntie van twee verschillende extractie methodes (DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen en phenol-chloroform) vergeleken.

Daarnaast zullen aanbevelingen die gedaan zijn in de pilot uit 2018-2019 “effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring van de rijkswateren” (Schutter et al., 2019) doorgevoerd worden. Met behulp van deze studie kan vastgesteld worden of de aanbevelingen leiden tot een gewenst resultaat. Dit betreft de volgende aanbevelingen:

- Door Schutter et al., (2019) is gefilterd met een open filter. Daarmee werd het membraan blootgesteld aan de buitenlucht. Bovendien waren er veel stappen nodig om het membraan met eDNA erop te conserveren. In het huidige project is gefilterd worden door middel van gesloten filtercapsules om vast te stellen of dit resulteert in minder DNA-vervuiling in de controle monsters.
- Het analyseren van de monsters door Schutter et al., (2019) heeft weliswaar plaats gevonden in gescheiden DNA-vrije, eDNA, pre-PCR en post-PCR laboratoria, echter waren deze laboratoria voorzien van standaard luchtvoorziening. Vanaf de mei 2019 worden analyses bij Datura uitgevoerd in een DNA-vrij/eDNA laboratorium waar sprake is van overdruk dat gecreëerd wordt door middel van HEPA-gefilterde lucht. Ook zijn het pre-PCR en post-PCR laboratorium voorzien van onderdruk. De verwachting is dat deze speciale luchtbehandeling resulteert in sterke reductie van de kans op vervuiling tijdens het laboratoriumproces.
- In de pilot door Schutter et al., (2019) bleek het lastig te zijn om onderscheid te maken tussen zeer lage concentraties DNA-vervuiling, en daadwerkelijke DNA detecties. Om beter grip te krijgen op de concentraties van DNA-vervuilingen is een interne standaard mee geamplificeerd. Op basis van deze interne standaard is het absolute aantal moleculen berekend. In de dataverwerking kunnen detecties die een lagere DNA-concentratie tonen dan in de controles verwijderd worden. In het huidige project is getest of deze methode in de praktijk toepasbaar is.
- In de pilot door Schutter et al., (2019) resulteerde een deel van de monsters in te weinig eDNA reads, ondanks de goede kwaliteit van de monsters. Dit bleek veroorzaakt te worden door het samenvoegen van de monsters. Dit werd gedaan op basis van gelijk volume PCR-product. In het huidige project zijn de

samples samengevoegd op basis van DNA-concentratie in plaats van een gelijk volume. In het huidige project is getest of dit resulteert in constanter resultaat.

- De data-analyse door Schutter et al., (2019) is uitgevoerd uitsluitend op basis van de resultaten van de 16S marker. In het huidige project zijn zowel de 16S als 12S resultaten gebruikt voor data-analyse. Het gebruik van beide markers resulteert in hogere detectiekansen (Schutter et al., 2019).

3. Methode

3.1 Bemonstering

3.1.1 Onderzoeksgebied

Er zijn twee onderzoeksgebieden bemonsterd: de Rijn bij Lobith en de Nieuwe waterweg. De bemonsteringen in Rijn bij Lobith en in de Nieuwe Waterweg zijn 28 mei respectievelijk 9/10 juni uitgevoerd.

Gekozen is voor de Nieuwe Waterweg vanwege de hoge soortenrijkdom. Voor Lobith is gekozen omdat hier in principe alleen zoetwatersoorten verwacht worden zodat er een goede check is in hoeverre er sprake is van vervuilingen tijdens de veld- en laboratoriumprocedures.

In ieder gebied zijn er op drie locaties monsters genomen (zie figuur 1 en 2), en is er één controle monster (blanco, MQ water) genomen. Met behulp van deze controle kan vastgesteld worden of er sprake is van contaminatie gedurende de bemonstering. In totaal zijn er dus 8 bemonsteringen uitgevoerd (zie tabel 1). Bij elk van deze bemonsteringen zijn 3 methodes toegepast (zie volgende paragraaf).

Tabel 1. Bemonsteringen per methode (3 methodes).

Gebied	Aantal locaties watermonster	Aantal controles (blanco)	Totaal
Nieuwe waterweg	3	1	4
Rijn (Lobith)	3	1	4



Figuur 1. Bemonsterde locaties in de Nieuwe Waterweg.



Figuur 2. Bemonsterde locaties in de Rijn bij Lobith.

3.1.2 Achtergrond type filters

In dit onderzoek is het verschil in bruikbaarheid onderzocht tussen dead-end filtratie (klein watervolume) en de cross-flow filtratie methode (groot watervolume):

- **Dead-end filters** (1,2 μM , PES-membraan) zijn filters waarmee >90% van de totale hoeveelheid eDNA uit het water gefilterd wordt in grotere wateren (Turner *et al.* 2014). Het water stroomt **door** het membraan heen en het eDNA blijft op het membraan achter. Met behulp van deze filters kan slechts één of enkele liters rivierwater gefilterd worden omdat het membraan op den duur verstopt raakt. In deze studie is er gebruik gemaakt van een filtercapsule die geleverd wordt door Smith-Rooth (Thomas *et al.* 2019).

Voordelen:

- Dit betreft een gesloten filtercapsule waarin het eDNA automatisch geconserveerd wordt, zonder dat er een vloeistof aan toegevoegd hoeft te worden. Dit beperkt het aantal handelingen in het veld, waardoor contaminatierisico beperkt is.
- Bemonstering kost slechts 10 minuten.
- Filters zijn relatief goedkoop in aanschaf.
- Filters zijn efficiënt te verwerken in het laboratorium.
- Deze filtercapsules zijn deels biologisch afbreekbaar.

Nadelen:

- Filters raken verstopt bij filteren van 700-1500 mL rivierwater waardoor de eDNA opbrengst mogelijk beperkt is. In deze studie is gekozen om maximaal 1000 mL te filteren om de verschillen in watervolume tussen monsters te beperken.
- **Cross-flow filters** (1 μM , PES) zijn filters waar het water **langs** het membraan stroomt. Het voordeel van deze filters is dat er geen verstopping optreedt, waardoor grote volumes water gefilterd kunnen worden. Door 40-45 minuten te filteren wordt 60 liter water gefiltreerd. In dit onderzoek is er gebruik gemaakt van Envirochek HV filters. Deze filters worden in het buitenland succesvol ingezet in soortenrijke systemen zoals rivieren (Valentini *et al.* 2016; Cilleros *et al.* 2019).

Voordelen:

- Waarschijnlijk is de eDNA opbrengst per monster groter dan bij dead-end filtratie, waardoor een vollediger soortenlijst gerealiseerd kan worden.

Nadelen:

- Er dient een conserverende vloeistof aan de gesloten filter-capsules toegevoegd te worden, wat risico op contaminatie vergroot.
- De filtratie met deze filters kost relatief veel tijd (circa 45 minuten per monster)
- De filters zijn duur in aanschaf.
- De verwerking van deze filters in het laboratorium is arbeidsintensief.

3.1.3 Methodes bemonstering

Op iedere locatie is één monster van 700-1000 mL (afhankelijk van hoe snel het filter verstopt raakt) verzameld doormiddel van dead-end filtratie. Daarnaast zijn er op dezelfde locaties twee monsters van 60 liter verzameld door middel van zogenaamde cross-flow filters (zie tabel 2). De cross-flow filters kunnen op twee manieren verwerkt worden in het laboratorium: door middel van een DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen of een phenol-chloroform extractie. Beide methodes zijn getest in dit project. Deze methodes worden in de volgende paragraaf nader toegelicht.

In totaal resulteert deze aanpak in 8 bemonsteringen maal 3 methodes = 24 monsters. Uit de pilot door Schutter et al., (2019) bleek dat er geen verschil was in soortenrijkdom tussen monsters die genomen zijn vanaf de oever en midden op de rivier. Daarom zijn alle monsters in dit project vanuit praktische overwegingen vanaf de oever verzameld.

Tabel 2. Toegepaste methodes per bemonsteringslocatie

Type bemonstering	Type extractie
Dead-end: 700-1000 mL dmv self-preserving filters (Smith-Rooth)	Phenol-chloroform (niet commercieel)
Cross-flow: 60 liter dmv Envirocheck HV sampling capsules	DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen)
Cross-flow 60 liter dmv Envirocheck HV sampling capsules	Phenol-chloroform (niet commercieel)

3.2 Laboratoriumanalyse

3.2.1 eDNA extractie

Het eDNA in de filtercapsules is geëxtraheerd. Het resultaat hiervan is een buisje met gezuiverd DNA. Storende stoffen zoals humuszuren kunnen detectie van het eDNA inhiberen wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de DNA-extractie zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.

Tijdens iedere extractie is een negatieve controle extractie uitgevoerd. Aan de negatieve controle extractie wordt geen eDNA monster toegevoegd, maar volgt verder de laboratoriumprocedure. Aan de hand van deze controle kan vastgesteld worden of er contaminatie heeft plaats gevonden gedurende de eDNA extractie, en kan een potentiële contaminatie gekwantificeerd worden.

eDNA extractie: dead-end filters

In het laboratorium wordt het membraan van de dead-end filters met daarop het eDNA uit de filtercapsule verwijderd. Het eDNA wordt geëxtraheerd en gezuiverd door middel van een phenol-chloroform extractie.

eDNA extractie: cross-flow filters

Op iedere locatie worden twee cross-flow filter monsters verzameld. Steeds zal het ene monster geëxtraheerd worden door middel van de DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen), en het andere monster door middel van een phenol-chloroform extractie. Onder andere Valentini *et al.* (2016) en Cilleros *et al.* (2019) hebben gedemonstreerd dat commerciële silica-kolom gebaseerde DNA-extractie kits zoals de DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) gebruikt kunnen worden voor de extractie van eDNA dat gefilterd is met Envirocheck HV filtercapsules.

Nadeel van deze methode is echter dat er in deze extractie gebruik gemaakt wordt van een silica-kolom waar het DNA aan hecht. Deze kolommen hebben een gelimiteerde capaciteit om DNA te binden. Als er meer DNA wordt aangeboden dan dat er aan de silica-kolom kan binden, gaat een deel van het DNA verloren. Mogelijk wordt hiermee het voordeel van het bemonsteren van een groot volume beperkt. Daarom is in dit project ook een phenol-chloroform extractie toegepast. Het grote voordeel van deze extractiemethode is dat de extractie resulteert in een hoge opbrengst omdat deze methode niet gelimiteerd wordt door de capaciteit van een silica-kolom. De verwachting op voorhand was dat de opbrengst van het eDNA verhoogd zou kunnen worden door gebruik te maken van een phenol-chloroform extractie, zodat optimaal gebruik gemaakt kan worden van de grote hoeveelheid eDNA dat in de filtercapsule verzameld wordt.

3.2.2 PCR amplificatie

Het DNA is geamplificeerd middels PCR met behulp van een 16S en 12S primer. De primers bevatten ieder 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 12 replica's. De PCR-producten van de 12 replica's zijn samengevoegd. Door middel van gelelektroforese is vastgesteld of de PCR geresulteerd heeft in PCR-producten van de juiste lengte.

Als DNA standaard zijn er aan iedere PCDR reactie twee artificiële DNA-fragmenten toegevoegd met een bekende sequentie. De sequenties van deze standaarden zijn duidelijk te onderscheiden van de DNA-sequenties van vissen. Het ene fragment wordt vermeerderd met de 12S primers en het andere fragment wordt vermeerderd met de 16S primers. Van beide fragmenten zijn 15 moleculen per PCR-reactie toegevoegd. Aan de hand van deze fragmenten wordt in de data verwerking berekend hoeveel eDNA van vissen in de monsters aanwezig was.

Tijdens de PCR in een negatieve controle PCR ingezet. In plaats van geëxtraheerd DNA is er water toegevoegd. Op basis van de negatieve controle PCR kan vastgesteld worden hoe groot de contaminatie is die optreedt tijdens het uitvoeren van de PCR.

3.2.3 DNA sequencing library voorbereiding

Door middel van een tweede PCR zijn Illumina Nextera XT adapters aan de PCR-producten gezet. Vervolgens zijn de PCR-producten samengevoegd. De pool van PCR-producten van verschillende samples is gezuiverd door middel van een bead clean-up. Deze pool van PCR-producten vormen de zogenaamde DNA library, wat gebruikt wordt om het DNA te sequencen. Bij het poolen van de monsters op de sequencer is gestreefd om van ieder monster 5.000.000 reads te verkrijgen. Dit betreft tamelijk veel reads voor één monster. Hiervoor is gekozen omdat deel van de reads van andere soortgroepen afkomstig is (bijvoorbeeld van andere gewervelden, en bij 16S ook ongewervelden).

3.2.4 DNA sequencing

De PCR-producten zijn gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing (Novaseq 6000 platform, 150 bp paired-end). Hierbij zijn miljoenen stukjes (zogenaamde reads) van het DNA uitgelezen. In deze stap wordt het fysieke DNA in het buisje dus vertaald in digitale reads.

3.3 Bio-informatica

Eerst is een standaard verwerking van Illumina paired-end data uitgevoerd. Deze omvat de volgende stappen:

1. FASTQ sequence files zijn gegenereerd met behulp van de Illumina Casava pipeline.
2. Een eerste kwaliteitscheck is uitgevoerd door middel van Illumina Chastity filtering.
3. Vervolgens zijn reads welke PhiX controle bevatten verwijderd.
4. (Restanten van) de sequencing adapters zijn uit de reads geknipt.
5. De kwaliteit van de overgebleven reads is getest met de FastQC tool.

Vervolgens worden de sequenties geanalyseerd met behulp van het software package Obitools. Deze pipeline resulteert uiteindelijk in een tabel waarin voor elk sample aangegeven is hoeveel reads er van elke soort gedetecteerd zijn. Omdat er behoorlijke rekenkracht nodig is voor het verwerken van de sequencing data wordt een workstation gebruikt welke beschikt over 2 40-core processoren met hyper-threading en 512 Gb Ram-geheugen. De volgende stappen zijn doorlopen:

1. **Illuminapairedend**: Genereren van een consensus sequentie op basis van de forward en reverse read.
2. **Obigrep**: sequenties die niet aligned werden zijn verwijderd.
3. **NGSfilter**: Op basis van de gebruikte primers en de tags die toegevoegd zijn in de eerste stappen, zijn alle sequenties toegewezen aan het corresponderende sample.
4. **Obiuniq**: Om de dataset die nu nog bestaat uit miljoenen reads hanteerbaarder te maken zijn alle identieke sequenties binnen een sample samengevoegd.
5. **Obigrep**: Sequenties die minder dan 10 keer voorkomen en korter zijn dan 25 basen worden verwijderd omdat dit sequencing fouten betreffen.
6. **Obiuniq**: Alle sequenties (ook van de verschillende monsters) worden samengevoegd.
7. **Ecotag**: De Ecotag tool wordt gebruikt om de sequenties te matchen met de referentie database. Deze database is opgebouwd op basis van referentie monsters die verzameld zijn door Datura, en aangevuld met DNA-sequenties afkomstig van museumvouchers.
8. **Obiclean**: Vervolgens is obiclean tool 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 sequentie B, en als sequentie A aanzienlijk minder voorkomt dan sequentie B. Sequentie B wordt vervolgens aanmerkt als 'head' (correcte sequentie).

Obiclean is 4 maal 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 ten opzichte van B. En 'd' staat voor het aantal verschillen tussen sequentie A en B.

9. **Obitab:** Tenslotte worden de resultaten geëxporteerd naar een .tab file.

Het vervolg van de pipeline is geprogrammeerd in Python. Hierin zijn diverse thresholds gehanteerd.

1. Threshold op de identity (mate waarmee een sequentie overeenkomt met de meest gelijkende sequentie in de referentie database). De volgende thresholds zijn gehanteerd: vissen 12S: 100%; vissen 16S: 98%.
2. Alle detecties die in één van de 4 runs met behulp van obiclean zijn aangemerkt als 'internal' in één van de obiclean runs zijn verwijderd. 'Singletons' zijn behouden gebleven.
3. Vervolgens is het absolute aantal moleculen berekend van iedere vissoort op basis van de artificiële DNA-fragmenten (de standaard). Dit is gedaan voor zowel de eDNA monsters, als de negatieve veldcontroles, extractie controles en PCR-controles.
4. Tenslotte zijn detecties van een soort verwijderd die in één van de controles een hoger signaal gaven dan in het betreffende monster.
5. De gemeten DNA-concentraties eDNA van elke soort met het 16S en 12S gen zijn gemiddeld.
6. Het uiteindelijke resultaat is geëxporteerd naar Excel.

3.4. Data-analyse

Er zijn diverse grafieken gemaakt in Excel en R is gebruikt voor het genereren van venndiagrammen en verzadigingscurves (iNEXT package). Er zijn te weinig monsters genomen om statistische analyses te kunnen uitvoeren. De analyses en figuren zijn gebaseerd op het totaal aantal gedetecteerde clusters. Dat wil zeggen dat sommige soorten die bijvoorbeeld met 12S niet te onderscheiden zijn en dus opgenomen zijn als dubbel soorten, (zoals *Perca fluviatilis/Sander lucioperca*) ook in dataset aanwezig zijn als *Perca fluviatilis* en *Sander lucioperca* apart van elkaar (op basis van 16S). Dit geldt voor 7% van de soorten in de dataset. Voor de vergelijking tussen de effectiviteit van de methodes is dit niet relevant. Het is echter wel goed om in het achterhoofd te houden dat de daadwerkelijke diversiteit in soorten ongeveer 7% lager is dan in de figuren is weergegeven.

4. Resultaten

4.1 Bemonstering

De bemonstering is goed verlopen; in alle gevallen kon succesvol water gefilterd worden. Het filteren van 60 liter water door middel van de Envirocheck HV capsules nam 40-45 minuten in beslag. Op een aantal locaties ging het filtreren van de laatste 15 liter langzamer dan de filtratie van het eerste deel omdat het filter langzaam dicht slibde. De gebruikte filters hebben een oppervlak van 1300 cm². Een kleiner oppervlak is niet aan te raden omdat het filtreren van 60 liter dan te lang kan duren of zelfs onmogelijk is

Het filteren van de klein volume monsters door middel van de PES-filters (self-preserving filters van Smith-Rooth) koste ongeveer 5 minuten. De filters die gebruikt zijn voor het filtreren van het kleine volume slibde vrij snel dicht. In een aantal gevallen kon slechts 700 mL water gefiltreerd worden. Inclusief verwerking van het monster kost bemonstering ongeveer 8 minuten.

4.2 DNA extractie

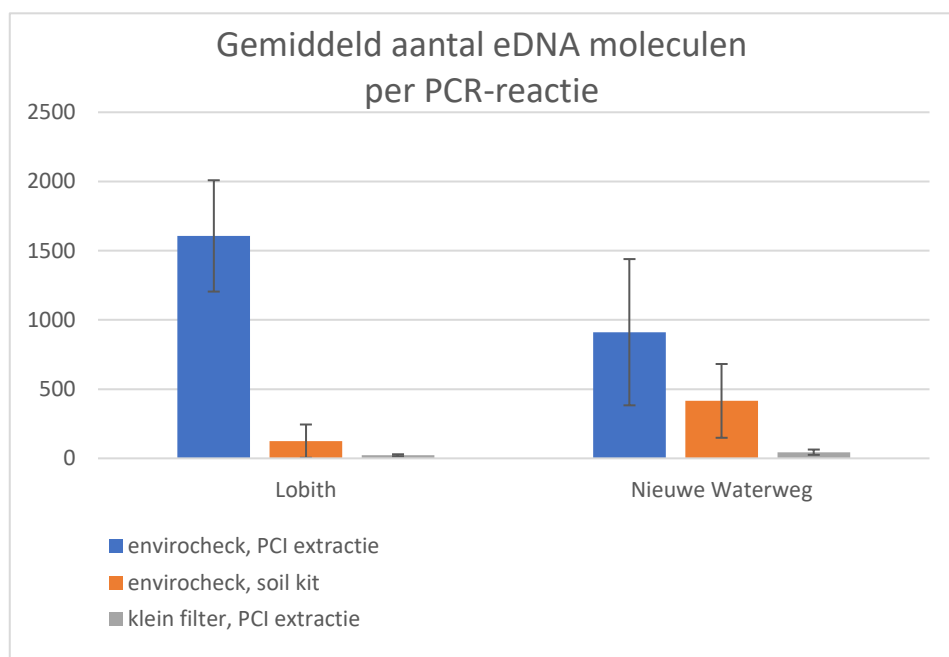
De DNA-extracties door middel van de phenol-chloroform extracties zijn succesvol uitgevoerd. Het uitvoeren van de extracties door middel van de DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen verliep moeizamer. Omdat in de grote rivieren tamelijk veel zeer fijn sediment in het water aanwezig zijn slibde de silica-kolommetjes in een aantal gevallen dicht. Bij één monster (verzameld bij Lobith) kon als gevolg van de hoge concentratie deeltjes weinig DNA verrkegen worden. De DNA-opbrengst van dit monster was te laag voor een succesvolle eDNA metabarcoding analyse.

4.2 DNA sequencing library preparation

De monsters zijn samengevoegd op basis van DNA-concentratie om ervoor te zorgen dat monsters waarvan de PCR minder efficiënt verloopt toch voldoende reads verkregen kunnen worden. In alle monsters werden in totaal meer dan 900.000 reads verkregen. In combinatie met het streven naar 5.000.000 reads per monster (incl eDNA van niet-vissen en PCR- en sequencingfouten) resulteerde dit in voldoende resolutie om een gevoelige analyse te realiseren.

4.3 DNA concentraties

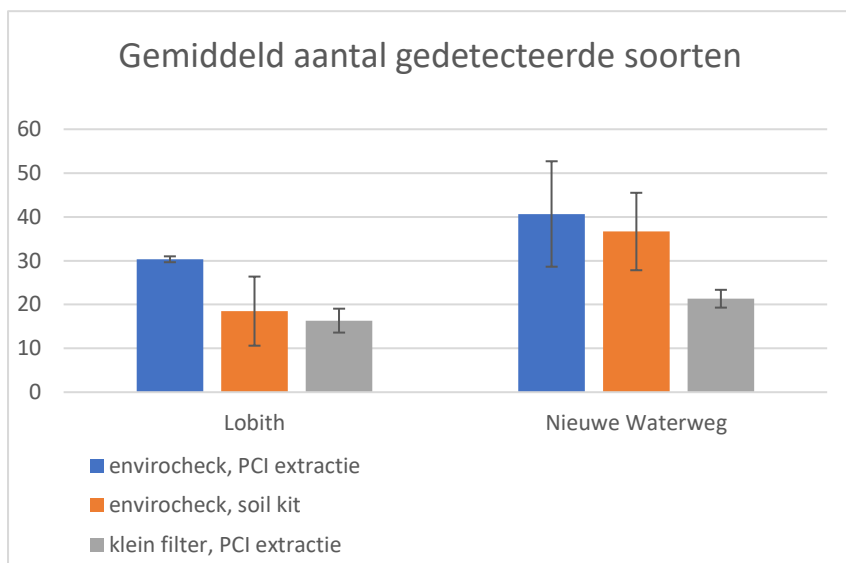
De gemiddelde DNA-concentraties per PCR-reactie is weergegeven in figuur 3. De hoogste concentratie werd verkregen door middel van een bemonstering met een Envirocheck capsule (60 liter) in combinatie met een phenol-chloroform extractie. Hoewel met beide envirocheck monsters steeds evenveel water gefiltreerd werd, was de verkregen DNA-concentratie door middel van de phenol-chloroform extractie aanzienlijk hoger dan in de monsters die geëxtraheerd werden middels een silica-kolom DNA-extractie. In twee Envirocheck monsters bij Nieuwe Waterweg locatie 3 werd een zeer hoge concentratie eDNA gemeten van griet (phenol-chloroform extractie 9547 moleculen/ PCR reactie en de soil kit 7654 moleculen/ PCR reactie). Vermoedelijk heeft in de oever een dode griet gelegen, waardoor een hoge concentratie eDNA gedetecteerd werd. Deze concentraties van het griet DNA zijn niet representatief voor de DNA-concentraties van de gehele populaties en zijn daarom behandeld als outlier bij het generen van figuur 3.



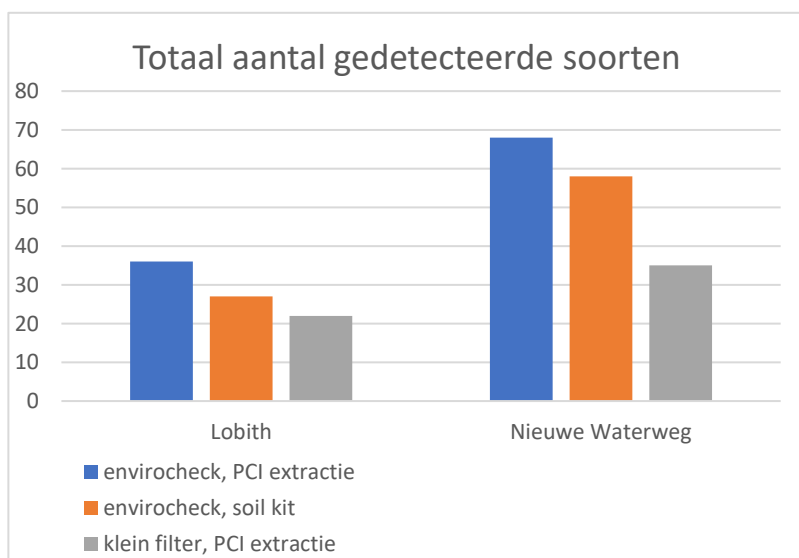
Figuur 3. Gemiddeld aantal eDNA moleculen per PCR-reactie. In ieder onderzoeksgebied zijn er met iedere methode drie monsters verzameld. Deze figuur geeft het gemiddeld aantal DNA-moleculen weer dat gemeten werd per PCR reactie. De monsters zijn ofwel gefiltreerd met een klein PES filter, of met een Envirocheck HV capsule. Tevens zijn de monsters geëxtraheerd door middel van de DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen (soil kit extractie) of door middel van een phenol-chloroform extractie (PCI extractie). In de Envirocheck monsters bij Nieuwe Waterweg locatie 3 werd een zeer hoge concentratie eDNA gemeten van griet. Deze detectie is behandeld als outlier, en verwijderd bij het generen van deze figuur.

4.4 Soortenrijkdom

Het gemiddeld aantal gedetecteerde soorten per methode is weergegeven in figuur 4. Het hoogste gemiddeld aantal soorten werd verkregen door middel van een bemonstering met een Envirocheck capsule (60 liter) in combinatie met een phenol-chloroform extractie. Hoewel de bemonstering van een klein volume (700-1000 mL) water een lage DNA-opbrengst gaf, zijn er in verhouding veel soorten waargenomen. Het totaal aantal soorten dat gedetecteerd werd door de bemonstering van drie locaties binnen het onderzoeksgebied was veruit het hoogste bij de bemonstering met de Envirocheck capsule (60 liter) in combinatie met een phenol-chloroform extractie (zie figuur 5). In figuur 6 wordt het de overlap geïllustreerd in gedetecteerde soorten tussen de drie toegepaste methodes. Hieruit blijkt dat vrijwel alle soorten die gedetecteerd zijn ook waargenomen werden met de Envirocheck capsules (60 liter) in combinatie met een phenol-chloroform extractie.

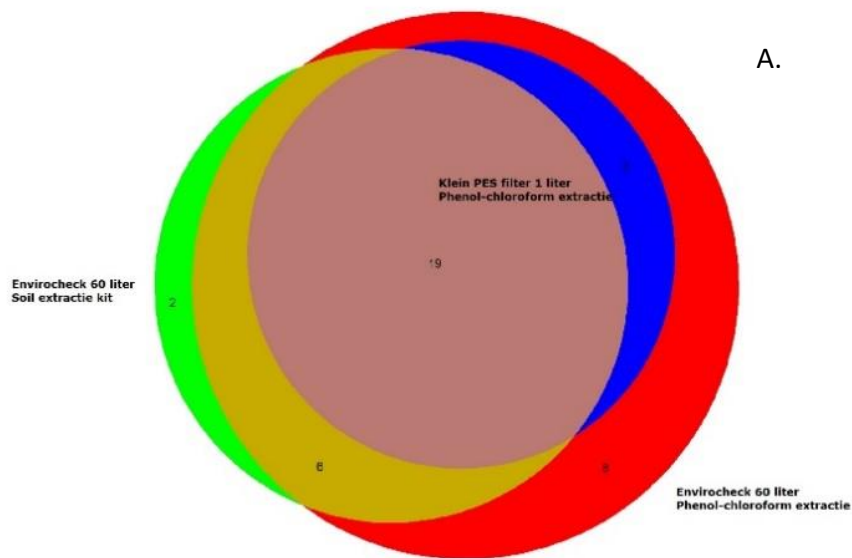


Figuur 4. In ieder onderzoeksgebied zijn er met iedere methode drie monsters verzameld. Deze figuur geeft het gemiddeld aantal soorten weer dat gedetecteerd werd in deze drie monsters. Eén monster dat verzameld werd bij Lobith werd niet succesvol geëxtraheerd door middel van de "soil kit". Dit monster is uit de dataset verwijderd bij het berekenen van het gemiddelde aantal soorten. Als dit monster behouden wordt, komt het gemiddelde bij Lobith met een "soil kit extractie" op 12,3 soorten. De monsters zijn ofwel gefilterd met een klein PES-filter, of met een Envirocheck HV capsule. Tevens zijn de monsters geëxtraheerd door middel van de DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen (soil kit extractie) of door middel van een phenol-chloroform extractie (PCI extractie).



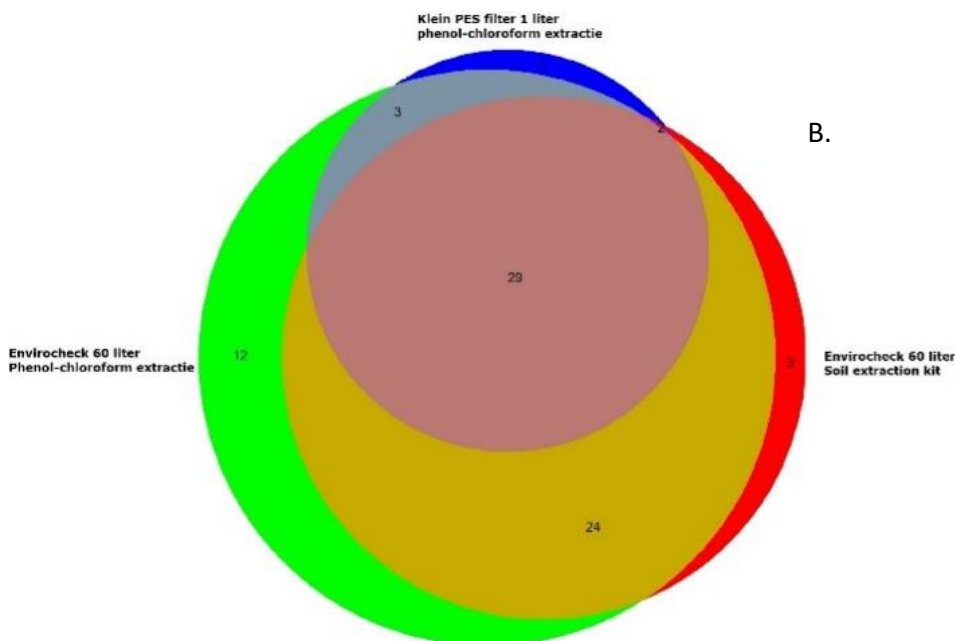
Figuur 5. In ieder onderzoeksgebied zijn er met iedere methode drie monsters verzameld. Deze figuur geeft het totaal aantal soorten weer dat gedetecteerd werd in deze drie monsters. De monsters zijn ofwel gefilterd met een klein PES-filter, of met een Envirocheck HV capsule. Tevens zijn de monsters geëxtraheerd door middel van de DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen (soil kit extractie) of door middel van een phenol-chloroform extractie (PCI-extractie).

A.



Figuur 6. Venn diagram waarin de overlap geïllustreerd wordt van de gedetecteerde soorten tussen de drie toegepaste bemonsteringstechnieken. A. Rijn van Lobith. B. Nieuwe Waterweg

B.



4.5 Vervuilingen

De monsters die verzameld zijn bij Lobith zijn in één batch geanalyseerd met de monsters die verzameld zijn bij de Nieuwe Waterweg. Om na te gaan in hoeverre er sprake is van vervuiling tijdens de handelingen in het veld en het laboratorium is gekeken of er marine soorten waargenomen zijn in de ruwe data (voor Python pipeline) van monsters die verzameld zijn in de Rijn bij Lobith. Van één mariene soort werd een lage concentratie DNA aangetroffen in de Rijn monsters. Dit betrof DNA van griet. Zoals toegelicht in paragraaf 4.3 werd een extreem hoge concentratie DNA van griet gedetecteerd in twee monsters uit de Nieuwe Waterweg. De hoge concentratie DNA in deze monsters heeft geleid tot vervuiling van andere monsters. Echter werd ook in de negatieve controles DNA van griet vastgesteld. Zoals toegelicht in paragraaf 3.3 zijn in stap 4 van de python pipeline detecties van een soort verwijderd die in één van de negatieve controles een hoger signaal gaven dan in het betreffende monster. Bij het toepassen van deze filterstap werden alle detecties van griet in de Rijn verwijderd. Goed is om op te merken dat bij het toepassen van deze filterstap (stap 4, python pipeline) uitsluitend waarnemingen verwijderd zijn van griet. Van alle andere soorten werd in alle monsters meer eDNA aangetroffen in de eDNA monsters dan in de negatieve veld, extractie en PCR-controles. Dit geeft aan dat het niveau van contaminatie in het algemeen zeer laag geweest is.

In de Nieuwe Waterweg werd in één monster DNA van bandeng waargenomen. Het is onduidelijk wat de bron dit DNA geweest is. Er werd geen enkele read van bandeng gedetecteerd in één van de andere monsters of in de controles. Vermoedelijk betreft dit dus geen vervuiling die opgetreden is tijdens de bemonstering of het laboratoriumproces. Waarschijnlijk is dit DNA afkomstig vanuit een lozing van een RWZI of schip.

4.6 Bijzondere waarnemingen

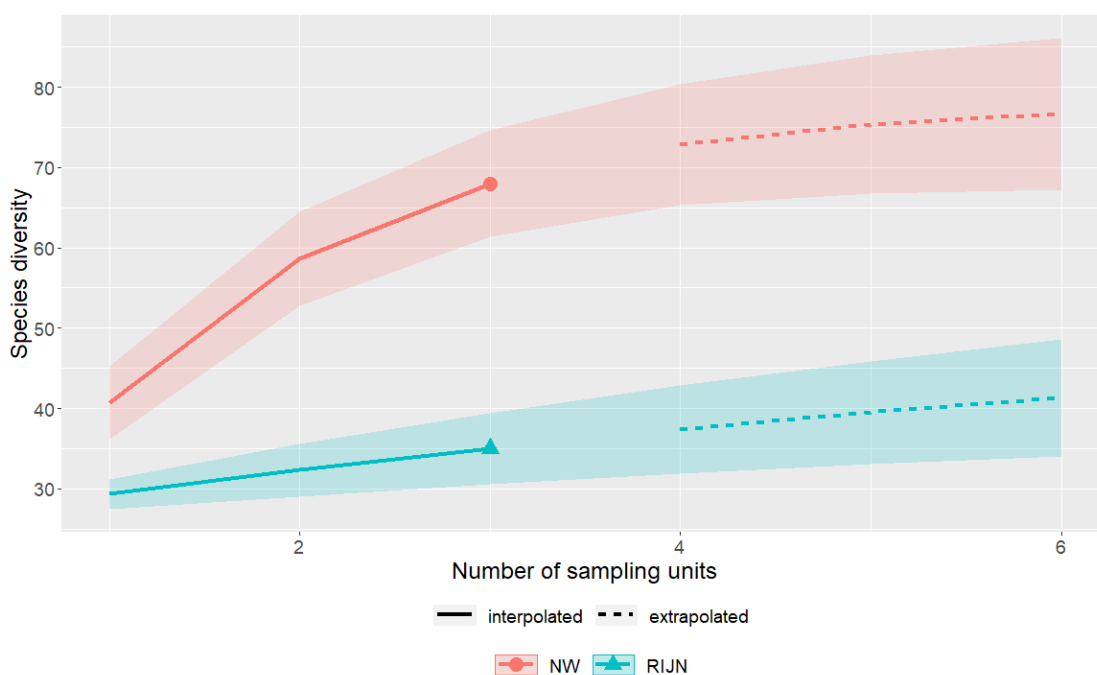
Zowel in de Nieuwe Waterweg als in de Rijn bij Lobith werd eDNA gedetecteerd van de Kaukasische dwerggrondel (*Knipowitschia caucasica*). Deze soort werd voor het eerst in het voorjaar van 2020 gevangen in het Haringvliet (natuurbericht, 2020). Opvallend is dat in 2018 honderden monsters, verspreid over het Haringvliet, Nieuwe Waterweg en de Rijn) geanalyseerd zijn door middel van eDNA metabarcoding, zonder dat deze soort gedetecteerd werd. Het feit dat de Kaukasische dwerggrondel in 2020 gedetecteerd werd op twee locaties, ondanks dat er een zeer beperkt aantal monsters verzameld is, geeft aan dat de Nederlandse rivieren gekoloniseerd zijn. In een aantal monsters in de Nieuwe Waterweg werden nog enkele andere zeldzame exoten gedetecteerd waaronder naakthalsgrondel (*Gobiosoma bosc*), paganelgrondel (*Gobius paganellus*) en blonde grondel (*Gobiusculus flavescens*).

5. Discussie

5.1 Evaluatie filtermethodiek

Er kon niet altijd 1000 mL water gefilterd worden met de self-preserving filters van Smith-Rooth. Filtratie van minder dan één liter filteren levert weinig soorten op. Er kan voor gekozen worden om met twee capsules te werken die ieder 500 mL filteren, en in het laboratoriumproces deze filters samen te voegen. Alternatief is om de filters te gebruiken Schutter et al., (2019) gebruikt hebben. Deze filters zijn groter, echter is de verwerking van de filters in het veld omvangrijker waarmee ook de kans op contaminatie in het veld toeneemt.

De envirocheck capsule (60 liter) in combinatie met een phenol-chloroform extractie gaf veruit het beste resultaat in termen van DNA-opbrengst en totaal aantal gedetecteerde soorten. Nadeel van deze methode zijn de hoge kosten van de filtercapsule, de lange tijd die bemonstering in beslag neemt en de tijdrovende verwerking van de filtercapsules in het laboratorium. Optioneel zou de extractie ook plaats kunnen vinden door middel van een commerciële extractie kit zoals de DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen. Echter dient het verlies van soorten dan gecompenseerd te worden door extra monsters te verzamelen. Op basis van verzadigingscurves kan gesteld worden dat met behulp van 6 monsters die verzameld zijn met Envirocheck filters, een zeer compleet beeld van de soortenrijkdom verkregen worden (zie figuur 6). Een kostenbete analyse moet duidelijk maken of de extra kosten opwegen tegen de hogere resolutie van de analyse. In tabel 3 is een voorlopige schatting opgenomen van het aantal monsters dat nodig is voor een volledige soortenlijst. Tevens zijn andere parameters in tabel 3 opgenomen op basis waarvan een kostenbete analyse opgesteld kan worden.



Figuur 7. Verzadigingscurves voor een bemonstering doormiddel van Envirocheck HV filters, waarbij de extractie plaatsvindt door middel van een phenol-chloroform extractie. NW= Nieuwe Waterweg; RIJN= Rijn bij Lobith. Deze curve is gebaseerd op bemonsteringen die eind mei/ begin juni uitgevoerd zijn. Het totaal aantal soorten zal vermoedelijk hoger uitvallen als de individuele monsters verspreid over het jaar verzameld worden.

Tabel 3. Overzicht van inspanning en kosten van een bemonstering door middel van de self-preserving filters van Smith-Rooth en de Envirocheck HV capsules. In het overzicht wordt vanuit gegaan dat er twee self-preserving filters nodig zijn voor een filtratie van 1000 mL.

	Self-preserving filters (Smith-Rooth) + phenol-chloroform extractie	Envirocheck HV + phenol-chloroform extractie
Aantal monsters zoetwater	-	6
Aantal monsters marien	-	6
Hands-on tijd filtratie	15 minuten (2 capsules)	60 minuten
Prijs filtercapsule	€40,- (2 capsules)	€120,-
Prijs laboratoriumverwerking	€250,-	€300

De gebruikte Envirocheck HV filters hebben een oppervlak van 1300 cm². Een kleiner oppervlak is niet aan te raden omdat het filtreren van 60 liter dan te lang kan duren of zelfs onmogelijk is. Bij een kleiner oppervlak van het filter is het dus aannemelijk dat (afhankelijk van de turbiditeit van het water op de plaats en tijd van bemonstering) een verschillend volume bemonsterd wordt. Dat is niet wenselijk gezien het bemonsterde volume dan niet gestandaardiseerd kan worden. Inclusief verwerking van het monster kost bemonstering ongeveer 60 minuten.

5.2 Evaluatie maatregelen tegen vervuiling

De enige contaminatie die plaats gevonden heeft tijdens de procedures in het veld en in het laboratorium betrof een vervuiling van DNA van griet. Deze vervuiling is waarschijnlijk afkomstig van twee watermonsters waarin een zeer hoge concentratie eDNA aangetroffen werd van griet. Vermoedelijk waren deze hoge concentraties eDNA afkomstig van een dood exemplaar in de oever. Het is daarom aan te raden om in de toekomst vanaf een boot te bemonsteren om uitschieters zoals griet te voorkomen. Ook komt er bij bemonsteren vanaf een boot minder sediment en wier mee dan bij een bemonstering vanaf de oever. In vergelijking met de pilot uitgevoerd door Schutter et al., (2019) kon het niveau van contaminatie sterk beperkt worden door het nemen van extra maatregelen in het veld en laboratorium. Dit is te verklaren doordat in het veld gewerkt is met gesloten filtercapsules en in de laboratoriumwerkzaamheden met een speciale luchtbehandeling. Het opzetten van de PCRs heeft plaats gevonden in een DNA vrije ruimte en de eDNA extractie heeft plaats gevonden in een eDNA ruimte. Deze beide ruimtes zijn voorzien van HEPA-filtering en overdruk. De PCRs en het voorbereiden van de DNA sequencing libraries heeft plaats gevonden in een PCR-ruimte waar onderdruk heerst. Deze luchtbehandeling resulteert in een zeer laag niveau van contaminatie tijdens laboratoriumprocedures en blijkt essentieel te zijn om eDNA metabarcoding onderzoek op grotere schaal (maandelijks opwerken van batches monsters) contaminatie vrij te houden. Dergelijke eisen zijn niet opgenomen in de Nederlandse Praktijkrichtlijn NPR 7394 (2016), moleculairbiologisch onderzoek van water. Het is dus belangrijk dat er hogere eisen gesteld worden aan laboratoria die eDNA onderzoek uitvoeren dan aan laboratoria die andere soortig DNA-onderzoek uitvoeren. Om deze reden wordt er op dit moment (najaar 2020) door een NEN-werkgroep verkend of de NPR 7394 zodanig aangepast kan worden dat eDNA onderzoek ook onder deze richtlijn kan vallen.

Het bepalen van de DNA-concentraties in de monsters door middel van een standaard was succesvol. Op basis van de standaard kon vastgesteld worden dat het griet eDNA dat gedetecteerd werd in de Rijn bij Lobith een contaminatie betrof. Met behulp van de standaard kon dus betrouwbaar onderscheid gemaakt worden tussen vervuilingen en daadwerkelijke detecties.

5.3 Evaluatie aanpassing DNA library preparation

Het samenvoegen van de verschillende monsters tijdens het voorbereiden van de DNA sequencing library heeft plaats gevonden op basis van DNA-concentratie. In de praktijk bleek dat deze methode voldoet om van alle monsters voldoende reads te verkrijgen.

6. Conclusies

Samenvattend kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- De envirocheck HV capsule (60 liter) in combinatie met een phenol-chloroform extractie gaf veruit het beste resultaat in termen van DNA-opbrengst en totaal aantal gedetecteerde soorten. Vermoedelijk zijn 6 monsters per jaar voldoende om een volledig beeld van de soortensamenstelling te krijgen (uitgaande van 3 bemonsteringen in het voorjaar en 3 bemonsteringen in het najaar).
- Andere crossflow-filters kunnen ook toegepast worden, mits de poriën 1 µm of kleiner zijn en het filtermembraan minimaal een oppervlak heeft van 1300 cm². Bij een kleiner membraanoppervlak zal een deel van de bemonsteringen resulteren in een filtratie van een kleiner volume dan 60 liter, omdat het filter dan te vroeg verstopt zal raken.
- Een alternatieve extractie methode (bijvoorbeeld commerciële kolom gebaseerde extracties zoals de DNeasy PowerSoil Kit van Qiagen) kunnen ook toegepast worden. Deze extractie methode is minder efficiënt en er zijn op jaarbasis meer dan 6 monsters nodig om tot een vergelijkbare soortenlijst te komen.
- Een kostenbete analyse moet duidelijk maken of de extra kosten van een bemonstering door middel van een envirocheck HV capsule (60 liter) opwegen tegen de hogere resolutie van de analyse.
- De extra maatregelen die genomen zijn in het veld en het laboratorium resulteren in een betrouwbare bemonstering.
 - Het werken met gesloten filtercapsules in het veld beperkt de kans op contaminatie;
 - Het voorzien van de DNA vrije ruimte en de eDNA ruimte van HEPA-filtering en overdruk, en het voorzien van de PCR-ruimte van overdruk resulteert in een zeer laag niveau van contaminatie tijdens laboratoriumprocedures;
 - Het is aan te bevelen om de eDNA bemonsteringen uit te voeren vanaf een boot zodat de kans op bemonstering van hoge concentraties DNA van een rottende vis in de oever beperkt wordt. Echter is het mogelijk om de bemonstering vanaf de oever te doen gezien uit deze studie blijkt dat op basis van de controles (standaard) dergelijke contaminatie goed aangetoond wordt, en op basis hiervan een eventuele vervuiling uit de data verwijderd kan worden.
- De standaard die toegevoegd is aan de PCR-reacties maakte het mogelijk om het aantal reads betrouwbaar te kwantificeren. Deze aanpak maakte het mogelijk om betrouwbaar onderscheid te maken tussen vervuilingen en daadwerkelijke detecties.
- Het samenvoegen van de verschillende monsters tijdens het voorbereiden van de DNA sequencing library dient plaats te vinden op basis van DNA-concentratie. Dit leidt tot voldoende reads in alle monsters.

7. Literatuur

Cilleros, Kevin, et al. "Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes." *Molecular ecology resources* 19.1 (2019): 27-46.

Ploegaert, Sanne., et al. "Kaukasische dwerggrondel negeert lockdown en vestigt zich in Nederland". *Natuurbericht* (7 juli 2020).

Schutter, Mirjam, et al. Effectiviteit van eDNA metabarcoding voor vismonitoring rijkswateren. Bureau Waardenburg Rapportnr. 19-147 (2019). Bureau Waardenburg, Culemborg.

Thomas, Austen C., et al. "A self-preserving, partially biodegradable eDNA filter." *Methods in Ecology and Evolution* 10.8 (2019): 1136-1141.

Turner, Cameron R., et al. "Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA." *Methods in Ecology and Evolution* 5.7 (2014): 676-684.

Valentini, Alice, et al. "Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding." *Molecular ecology* 25.4 (2016): 929-942.