

eDNA metabarcoding vissen

Verkennend onderzoek naar de mogelijke
toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring

Jelger Herder en Jan Kranenbarg



eDNA metabarcoding vissen

Verkennd onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring

Jelger Herder en Jan Kranenbarg

stowa



waternet



Colofon

Status uitgave:	Concept
Rapportnummer STOWA:	2016-19
ISBN nummer:	978.90.5773.729.9
Datum uitgave:	27-06-2016
Titel:	eDNA metabarcoding vissen
Subtitel:	Verkennend onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring
Wijze van citeren:	Herder J.E., en J. Kranenbarg, 2016. eDNA metabarcoding vissen - Verkennend onderzoek naar de mogelijke toepassing van eDNA voor de KRW vismonitoring, RAVON/STOWA rapport 2016-19.
Samenstellers:	Jelger Herder, en Jan Kranenbarg
Foto's omslag:	eDNA bemonstering Boven Donge - foto: Marco Beers Zoetermeerse Plas - foto: Jelger Herder
Aantal pagina's incl. bijlagen:	48
Projectnummer:	2015.077
Projectleider:	Jelger Herder
Opdrachtgevers:	STOWA, Waterschap Brabantse Delta, Waterschap de Dommel, Waterschap Rijn & IJssel, Wetterskip Fryslân, Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard, Hoogheemraadschap van Rijnland, Hoogheemraadschap van Delfland, Waternet, Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, Waterschap Scheldestromen en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier.

Inhoud

1	Inleiding	5
1.1	Kader	5
1.2	Doelstellingen	7
1.3	Dankwoord	7
2	Onderzoeksopzet	8
2.1	Onderzoeklocaties	8
2.2	Monstername	10
2.2.1	KRW-visbemonsteringen	10
2.2.2	eDNA-metabarcoding bemonsteringen	10
2.3	Analyse eDNA monsters	11
3	Resultaten	13
3.1	Aantal soorten per traject: eDNA versus KRW-visbemonstering	13
3.2	Trefkans per soort: eDNA versus KRW-visbemonstering	14
3.2.1	Percentage gemiste soorten met eDNA en de KRW-visbemonstering	15
3.3	Reproduceerbaarheid eDNA metabarcoding	17
3.3.1	Vergelijking van herhaalde laboratoriumanalyse	17
3.3.2	Vergelijking van herhaalde monstername in het veld watermonsters	18
3.4	Benodigd aantal monsters voor soortdetectie	20
3.5	Correlatie tussen aandeel eDNA, biomassa en aantal per vissoort	21
4	Discussie, aanbevelingen & conclusies	22
4.1	Bepaling soortsaamenstelling	22
4.1.1	Detectie van soorten met eDNA versus de KRW-visbemonstering	22
4.1.2	Trefkans per soort	22
4.1.3	Onverwachte soorten met eDNA-metabarcoding	23
4.1.4	Soorten die nog niet geïdentificeerd kunnen worden met eDNA	24
4.2	Correlatie tussen aandeel eDNA, biomassa en aantal per vissoort	26
4.3	Reproduceerbaarheid eDNA metabarcoding	28
4.4	Benodigd aantal monsters voor soortdetectie	28
4.5	Conclusies	30
5	Hoe verder	31
5.1	Onderzoekstraject	31
5.2	Tijdspad	33
5.3	Verwachte kostenreductie	33
6	Literatuur	34
	Bijlage 1 – tabellen	36
	Bijlage 2 – details onverwachte soorten	43
	Bijlage 3 – statistiek reproduceerbaarheid monstername	46

1 Inleiding

1.1 Kader

In 2000 is de Kaderrichtlijn Water (KRW) van kracht geworden in de lidstaten van de Europese Unie. De KRW voorziet in de bescherming en verbetering van aquatische ecosystemen en duurzaam gebruik van water. Het doel is voor alle wateren een 'goede toestand' te bereiken. De 'goede toestand' is onderverdeeld in een goede chemische en een goede ecologische toestand. De ecologische toestand wordt bepaald aan de hand van kwaliteitselementen waaronder vissen. Om de ontwikkeling van de ecologische toestand voor vissen te volgen voeren de waterschappen en Rijkswaterstaat periodiek visbemonsteringen uit. Deze KRW-visbemonsteringen worden uitgevoerd volgens de methodiek uit het Handboek Hydrobiologie (STOWA, 2010) waarbij conventionele methoden zoals fuiken, electrovisserij en zegens worden ingezet.

Sinds 2011 is in Nederland en een aantal andere landen zoals Denemarken, Frankrijk, Engeland en de Verenigde Staten de innovatieve environmental DNA-methode (eDNA) sterk in opkomst. De methode is gebaseerd op het feit dat organismen die in het water leven daarin kleine stukjes DNA achter laten via faeces, urine en huidcellen. Door het oplossend vermogen van water worden deze kleine stukjes DNA verspreid over een groot volume en oppervlak. Dit DNA is in het lab aan te tonen met behulp van primers en PCR. De methode heeft gemiddeld een (veel) hogere trefkans, is niet invasief (soorten hoeven niet gevangen te worden), heeft de potentie om in hoge mate gestandaardiseerd te kunnen worden en kan een kostenbesparing vormen ten opzichte van de huidige visbemonstering (zie overzicht in Herder *et al.*, 2014a).

De eerste eDNA toepassingen maakten gebruik van soortspecifieke primers voor het detecteren van één of enkele doelsoorten in een watermonster (Ficetola *et al.*, 2008). Het eerste Nederlandse onderzoek richtte zich op de detectie van grote modderkruipers (Herder *et al.*, 2012). Voor het gelijktijdig detecteren van alle vissoorten in een eDNA monster is de methode met soortspecifieke primers niet geschikt (zie kader). Dit is wel mogelijk met eDNA metabarcoding waarbij middels gebruik van universele primers het DNA van een hele soortgroep (in dit geval vissen) vermeerderd wordt. Door de DNA-codes uit te lezen middels Next Generation Sequencing en deze vervolgens te vergelijken met een referentiedatabase kan een complete soortenlijst gegenereerd worden.

In 2013 heeft RAVON i.s.m. STOWA, Waterschap Rijn & IJssel, Waterschap de Dommel, Waterschap Brabantse Delta en Waterschap Vallei en Veluwe een eerste pilot in Nederland uitgevoerd naar de toepassing van eDNA metabarcoding voor vissen. De resultaten waren bemoedigend. In stilstaande wateren werden evenveel of meer vissoorten gedetecteerd met eDNA dan in de gelijktijdige KRW bemonsteringen met traditionele vangtuigen. Ook leek er een verband tussen de gevangen aantallen per vissoort en de hoeveelheid eDNA: van soorten die het meest gevangen werden werd veelal ook het meeste eDNA gevonden (Herder *et al.*, 2015). In stromende wateren vielen de resultaten tegen. De oorzaak daarvan lag in de toegepaste monstermethode en conservering van de monsters.

Gezien de bemoedigende resultaten van de eerste pilotstudie is er in 2015, samen met STOWA en elf waterschappen, een vervolgstudie uitgevoerd waarin de methode op een veel groter aantal locaties en verschillende watertypen getest is. Onderhavige rapportage gaat in op de resultaten van deze vervolgstudie.

Kader 1 - achtergrond environmental DNA (eDNA)

eDNA barcoding

De eerste eDNA toepassing betrof de detectie van Amerikaanse brulkickers in Frankrijk (Ficetola et al., 2008). Sindsdien heeft de methode een vlucht genomen en volgden er vele onderzoeken aan een scala van soorten. Het eerste onderzoek in Nederland richtte zich op soortspecifieke eDNA detectie van de grote modderkruiper (Herder et al., 2012). In deze pilotstudie werd in het veld voor de eDNA methode een trefkans van 87,5% gevonden, dit bleek veel hoger dan met huidige methoden zoals electrovisserij. In vervolgonderzoeken (Herder et al., 2013b; De Bruin et al., 2014) werden deze resultaten bevestigd. Andere vissoorten waarvoor in het buitenland vergelijkbare resultaten zijn behaald zijn onder andere zilverkarper en grootkopkarper (Jerde et al., 2011), karper (Takahara et al., 2012), zonnebaars (Takahara et al., 2013) en zeeprik en zeeforel (Gustavson et al., 2015). In al deze onderzoeken is gewerkt met soortspecifieke primers die enkel het DNA van de doelsoort vermeederen, ook wel eDNA barcoding genoemd. Met eDNA barcoding is het slechts mogelijk één tot enkele soorten gelijktijdig in een watermonster te detecteren.

eDNA metabarcoding

Het identificeren van meerdere soorten tegelijk uit een environmental DNA monster wordt eDNA metabarcoding genoemd (Taberlet *et al.*, 2012). Voor deze methode, zijn onder andere primers ontwikkeld die zich richten op de soortgroep vissen als geheel. Hierbij wordt het DNA van alle vissen uit een monster vermeederd. Vervolgens worden de vermeederde DNA-codes uitgelezen door middel van Next Generation Sequencing (NGS) waarna een databestand wordt verkregen met alle DNA-codes. Op de computer wordt vervolgens een match gemaakt tussen deze DNA-codes en een referentiedatabase (codes van alle soorten). Bij een grootschalig onderzoek in Frankrijk (o.a. Rhone), Nederland (Herder et al., 2014b) en Denemarken werden hogere aantallen soorten aangetroffen met eDNA metabarcoding dan met gelijktijdige bevissingen met traditionele methoden. Deze resultaten zijn onlangs gepubliceerd in *Molecular Ecology* (Valentini et al., 2016).

eDNA barcoding versus eDNA metabarcoding

eDNA metabarcoding heeft de voorkeur boven een meervoudige soortspecifieke eDNA barcoding (waarbij voor iedere soort een aparte PCR met een soortspecifieke primer wordt uitgevoerd). Doordat de hoeveelheid eDNA in een monster beperkt is, moeten er bij een meervoudige soortspecifieke benaderingen voor iedere soort apart PCRs in replica worden uitgevoerd. De hoeveelheid eDNA in een monster is dan slechts toereikend voor het gelijktijdig analyseren van enkele soorten. Hoofdstuk 4 van het in 2014 verschenen review over de toepassingsmogelijkheden van eDNA (Herder *et al.*, 2014a) bevat een uitgebreide beschrijving en vergelijking van beide methoden.

1.2 Doelstellingen

Het hoofddoel van het in 2013 gestarte onderzoekstraject is, onderzoeken of eDNA metabarcoding een alternatief kan vormen voor de huidige KRW-visbemonsteringen. Het in 2015 uitgevoerde onderzoek had tot doel om:

1. De toepasbaarheid van de methode opnieuw testen met een aangepaste monsternamen op een groter aantal locaties en watertypen verspreid over Nederland (zowel stilstaand als stromend water en zowel zoet als brak water).
2. Het testen van de reproduceerbaarheid van de eDNA methode: door meerdere monsters te verzamelen op één locatie kan worden onderzocht of deze dezelfde uitkomsten geven.
3. Verder inzicht krijgen in de mogelijkheden voor kwantificering van de visstand middels eDNA (verhouding tussen de hoeveelheid DNA per soort in het monster en de in de KRW-visbemonstering gevangen aantallen en biomassa per soort).

Om deze onderzoeksvragen te beantwoorden zijn er 63 eDNA monsters genomen op 55 locaties in 34 KRW-waterlichamen en een aantal kleinere wateren van het roulerend meetnet van Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden. De waterlichamen behoorden tot het R-type (R4- en R6-type) en M-type (10 verschillende M-typen). De eDNA resultaten zijn vergeleken met de uitkomsten van de standaard KRW-visbemonsteringen die, kort nadat de eDNA monsters genomen waren, werden uitgevoerd op de onderzochte locaties.

1.3 Dankwoord

Het onderzoek is uitgevoerd met financiële ondersteuning van STOWA, Waterschap Brabantse Delta, Waterschap de Dommel, Waterschap Rijn & IJssel, Wetterskip Fryslân, Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard, Hoogheemraadschap van Rijnland, Hoogheemraadschap van Delfland, Waternet, Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, Waterschap Scheldestromen en Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier. Vanuit deze organisaties is een begeleidingsgroep samengesteld met daarin Bas van der Wal (STOWA), Marco Beers (Waterschap Brabantse Delta), Mark Scheepens (Waterschap de Dommel), Matthijs de Vos (Waterschap Rijn & IJssel), Roelof Veeningen (Wetterskip Fryslân), Johan van Tent (Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard), Bart Schaub (Hoogheemraadschap van Rijnland), Wil van der Ende (Hoogheemraadschap van Delfland), Tim Pelsma en Laura Moria (Waternet), Danneke Verhagen-Bakker en Brigitte Mangelaars (Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden), Marius van Wingerden (Waterschap Scheldestromen) en Gert van Ee (Hoogheemraadschap Noorderkwartier). Wij zijn hun hiervoor zeer erkentelijk. Daarnaast danken wij ATKB, Bureau Waardenburg en Stichting Zeeschelp voor het aanleveren van de gegevens van de KRW-visstandbemonsteringen.

2 Onderzoeksopzet

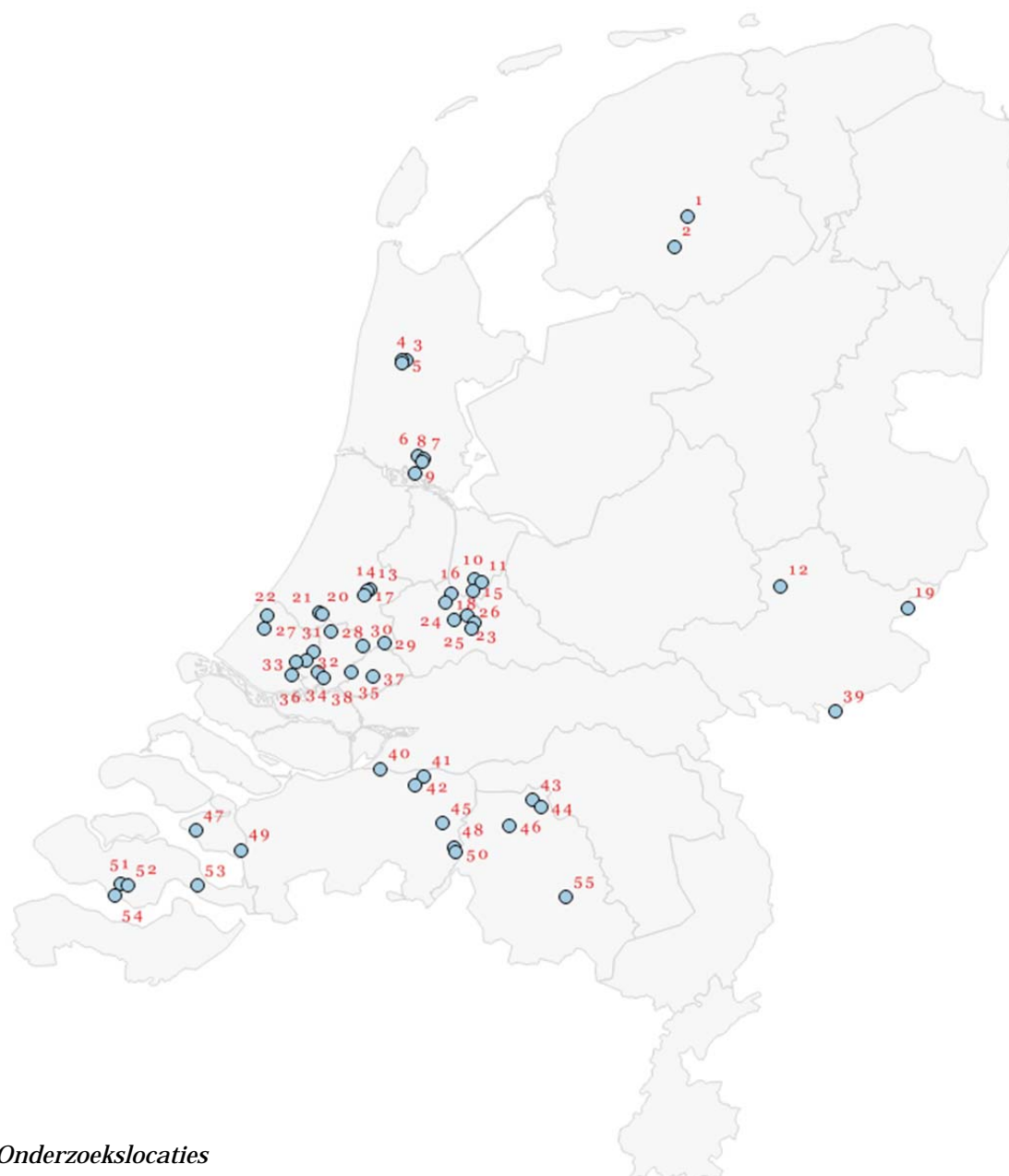
2.1 Onderzoeklocaties

De onderzoeklocaties zijn in samenspraak met de deelnemende waterschappen geselecteerd. Hierbij is gekozen voor locaties waar in 2015 KRW-visbemonstering en uitgevoerd zouden worden. Door op deze locaties een eDNA bemonstering uit te voeren hoefde er voor de vergelijking geen extra visbemonsteringen uitgevoerd te worden.

Bij de keuze van onderzoeklocaties is gepoogd om zoveel mogelijk verschillende watertypen mee te nemen. Tabel 1 geeft een overzicht van het aantal onderzochte locaties per KRW-watertype. Er zijn op 9 locaties stromende wateren bemonsterd (R-typen) en op 43 locaties stilstaande KRW-wateren (M-watertypen). Daarnaast zijn er 3 locaties van het Roulerend Meetnet van HDSR bemonsterd, dit betreft kleinere stilstaande wateren die niet onder een KRW waterlichaam vallen. De stromende wateren variëren van kleine bovenloopjes tot bredere traag stromende riviertjes zoals de Berkel, Beneden Donge en Esche Stroom. De lijnvormige stilstaande wateren varieerden van kleine poldervaarten tot grachten in Den Haag en grote diepe kanalen zoals het afwateringskanaal Eindhoven. De overige stilstaande wateren varieerden van petgaten en ondiepe laagveenplassen tot grote zandwinplassen. Tot slot zijn er in de pilot ook een aantal brakke wateren opgenomen in Zeeland en de Noorder IJplas in Noord-Holland. Hiermee is een groot deel van de in Nederland voorkomende watertypen onderzocht.

Tabel 1: Overzicht bemonsterde watertypen en aantal monsters per watertype

KRW-watertype	Beschrijving	Aantal monsters
M10	Laagveen vaarten en kanalen	2
M14	Ondiepe gebufferde plassen	11
M20	Matig grote diepe gebufferde meren	6
M27	Matig grote ondiepe laagveenplassen	6
M3	Gebufferde (regionale) kanalen	5
M30	Zwak brakke wateren	7
M31	Kleine brakke tot zoute wateren	2
M6b	Grote ondiepe kanalen met scheepvaart	1
M7b	Grote diepe kanalen met scheepvaart	4
M8	Gebufferde laagveensloten	3
R4	Permanent langzaam stromende bovenloop op zand	3
R6	Langzaam stromend riviertje op zand	9
geen KRW-water	Kleine stilstaande wateren roulerend meetnet HDSR	3



Figuur 1: Onderzoekslocaties

1 De Deelen	16 Ouenaar Haarrijn	31 Polder Berkel 2	46 Esche Stroom - Nemer
2 Nannewijd	17 Zegerplas - Kromme Aar West	32 Polder Berkel 1	47 Stavenisse
3 Oosterdel 1	18 Bijleveld - RM	33 Oostboezem - Berkelsche Zweth	48 Boven Donge - Leijkant
4 Oosterdel 2	19 Berkel grens Rekken	34 Bergse Voorplas	49 Eendracht
5 Oosterdel 3	20 Zoetermeerse plas 1	35 Sloten waterrijk EGB	50 Boven Donge - Oude Leij Riel
6 Twiske - Zijwater Stooterplas	21 Zoetermeerse plas 2	36 Oostboezem - Polderwetering	51 Borssele 1
7 Twiske - Stooterplas 2	22 Oostboezem - Singels den Haag	37 Sloten waterrijk Berkenwoude	52 Borssele 2
8 Twiske - Stooterplas 1	23 Leidsche Rijn	38 Kralingse Plas	53 Glerum
9 Noorde IJplas	24 Bijleveld	39 Aa strang	54 Borssele 3
10 OBT - Dwarsdijk	25 Vasco da Gamalaan	40 Gat van den Ham	55 Afwateringskanaal Eindhoven
11 Westbroekse Zodden	26 Schermerhornpark Nieuwegein	41 Beneden Donge - Keizersveer	
12 Berkel Zutphen	27 Oostboezem - Korte Laak	42 Beneden Donge - Nion	
13 Zegerplas - Kromme Aar Oost	28 Vaart Bleiswijk	43 Essche Stroom	
14 Zegerplas	29 Polder Stein	44 Midden en beneden Dommel	
15 Grote Maarsseveense plas	30 Ringvaart Gouda	45 Boven Donge - Reeshof	

2.2 Monsternamen

2.2.1 KRW-visbemonsteringen

De KRW-visbemonsteringen zijn uitgevoerd door de adviesbureaus ATKB (bij 8 waterschappen), Bureau Waardenburg (bij Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard), Stichting Zeeschelp (bij Waterschap Scheldestromen) en door eigen personeel (Waterschap Rijn en IJssel). De toegepaste methodieken betroffen doorgaans elektrisch vissen (met Deka, Brettschneider of aggregaat) of zegen en in de helft van de gevallen een combinatie van beiden op 1 traject. In enkele wateren bij Waterschap Scheldestromen is er naast de zegen ook gebruik gemaakt van schietfuis en een leusnet. Op het Nanneveld is een stortkuil ingezet. De KRW-visbemonsteringen zijn uitgevoerd volgens het Handboek Hydrobiologie (STOWA, 2010). In Bijlage 1 (tabel a) is per traject weergegeven welke methoden ingezet zijn.

Voor de analyses is gebruik gemaakt van de gevangen aantallen individuen en biomassa per soort per traject. De biomassa is berekend via omrekenfactoren voor lengte-gewicht. Er is niet gecorrigeerd voor vangstinspanning en bevist oppervlak. Er is voor de vergelijking met de biomassa enkel gekeken naar de verhoudingen tussen soorten en niet naar absolute biomassa.

2.2.2 eDNA-metabarcoding bemonsteringen

De eDNA monsters zijn op de onderzochte locaties steeds genomen binnen het KRW-bemonsteringstraject. De monsters zijn altijd voor de KRW-visbemonstering verzameld. Op deze manier wordt uitgesloten dat de KRW-visbemonstering voor een vertekening van de eDNA resultaten zorgt (bijvoorbeeld door het extra vrijkomen van DNA omdat vissen gevangen worden).

Monstermethode

Alle monsters zijn verzameld met VigiDNA filters, speciaal ontwikkeld voor eDNA (poriegrootte 0,45µm), waarmee water reeds in het veld gefiltreerd wordt. Er zijn twee verschillende eDNA monstermethoden toegepast:

- Zak met filter: bij deze methode zijn schepjes water verspreid over het traject verzameld in een plastic zak. Vervolgens is het in de zak verzamelde water door het eDNA filter gepompt.
- Pomp met filter: bij deze methode is middels een peristaltische pomp met een slang water verspreid over het hele traject door het eDNA-filter gepompt. Hiermee kan een groter volume gefiltreerd worden, afhankelijk van de troebelheid van het water (bij troebel water loopt het filter sneller vol).

In (kleinere) stilstaande wateren is de methode met de zak en filter ingezet. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat met deze methode in wateren kleinere dan 1 hectare goede resultaten behaald worden (o.a. Ficitola *et al.*, 2008, Herder *et al* 2012, 2013d en Thomsen *et al.*, 2012b). De methode heeft daarnaast in troebele wateren een voordeel ten opzichte van de methode met pomp en filter. In troebele wateren kan het filter namelijk vollopen voordat het hele traject met de pomp bemonsterd is. Door eerst water met schepjes te verzamelen in de zak en te mengen kan er, ondanks dat mogelijk niet al het water door het filter gaat, wel een goed beeld van het hele traject verkregen worden.

In stromende wateren is de verblijftijd van het water korter en wordt eDNA sterker verdund waardoor er naar verwachting minder eDNA op een locatie aanwezig is in vergelijking tot stilstaande wateren. Ook in grotere stilstaande wateren is de verdunning van eDNA naar verwachting groter. Het filter met de peristaltische pomp heeft in dergelijke wateren de voorkeur vanwege het grotere monstervolume. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat deze methode in (grotere) stromende wateren succesvol is (Valentini et al., 2016).

Monstername

In kleinere wateren zijn de monsters vanaf de oever verzameld, of wadend tegen de stroom in (om besmetting met eDNA vanaf het waadpak uit te sluiten). In grotere wateren zijn de monsters verzameld vanuit een varende boot waarbij voor de boot uit gemonsterd is om besmetting vanaf de boot uit te sluiten. Bij het verzamelen van de eDNA monsters zijn alle voorzorgsmaatregelen genomen om contaminatie van de monsters met eDNA van andere locaties te voorkomen (Herder et al., 2014a). Zo is er op iedere locatie met nieuwe (disposable) DNA-vrije materialen gewerkt.

Conservering en verzending

Direct na de monstername zijn de filters voorzien van een conserveringsbuffer. De filters zijn vervolgens in een koelbox bewaard en op het RAVON kantoor in Nijmegen in een koelkast geplaatst tot aan verzending. Alle monsters zijn binnen een maand na monstername per 24 uren koerier naar het laboratorium in Frankrijk verstuurd.

2.3 Analyse eDNA monsters

Gebruikte primers

In deze pilot studie zijn universele primers gebruikt die al het DNA van vissen vermeerderen. De primers richten zich op een kort mitochondriaal DNA fragment (kleiner dan 95 basenparen) op het 12S gen. Het voordeel van mitochondriaal DNA is dat in elke cel meerdere kopieën aanwezig zijn waardoor het in veel hogere concentraties aanwezig is dan nucleair DNA. De primers worden uitgebreid beschreven in Valentini et al. (2016). Belangrijke eigenschappen van de primers zijn:

- De primers richten zich op een kort eDNA fragment (Taberlet, 2012; Turner et al., 2014). Dit is belangrijk omdat eDNA in het water snel afbreekt en fragmenten typisch korter zijn dan 100 a 150 basenparen (Deagle et al., 2006). Primers die zich op lange fragmenten richten hebben dus een lagere trefkans.
- De primers vermeerderen eDNA van alle vissoorten (en prikken) maar daarnaast van weinig andere soorten. Ze zijn dus erg specifiek voor vissen. Dit is belangrijk omdat als primers veel andere soorten zouden vermeerderen, deze andere soorten dan de resultaten voor de vissen kunnen gaan overschaduwen (maskeren).
- Het door de primers vermeerderde fragment is zeer variabel waardoor de meeste vissoorten op basis van dit fragment onderscheiden kunnen worden (bijna iedere vissoort heeft een unieke DNA-sequentie op dit fragment). Dit wordt ook wel een hoge 'resolutie' genoemd.
- De primers binden op een conservatief stukje DNA dat nagenoeg gelijk is gebleven tussen de verschillende vissoorten. Desalniettemin kan het zijn dat er bij bepaalde soorten enkele baseparen gemuteerd zijn. Dit geeft zogenaamde mismatches, de primer kan dan nog steeds binden maar iets minder goed wat kan leiden tot een verschil in vermeerdering tussen vissoorten. De gebruikte primers geven een laag

percentage mismatches voor vissoorten in vergelijking tot andere voor vissen voorgestelde universele primers (bv die van Thomsen et al., 2012a en Kelly et al., 2014).

Extractie en PCR

Per monster is het DNA geëxtraheerd en zijn er vervolgens 12 afzonderlijke PCRs gedraaid met de universele primers voor vissen (zie hierboven). Dit hoge aantal PCRs per monster is noodzakelijk voor detectie van zeldzame soorten (Ficetola et al., 2014). Hiermee is al het in de monsters aanwezige DNA van vissen vermeerderd. In de analyse zijn ook een aantal negatieve controles meegenomen. Daarnaast wordt gecheckt of de PCR geslaagd is en of het aantal verkregen sequenties in de orde van grootte ligt van het verwachte aantal. Deze controles samen laten zien dat er geen besmetting is geweest tijdens de analyse en dat de analyse goed verlopen is. SPYGEN beschikt over een speciaal voor eDNA ingericht lab. Dit is noodzakelijk omdat bij het werken met dergelijk kleine hoeveelheden DNA de kans op besmetting van de monsters groot is.

Sequencing en Bioinformatica

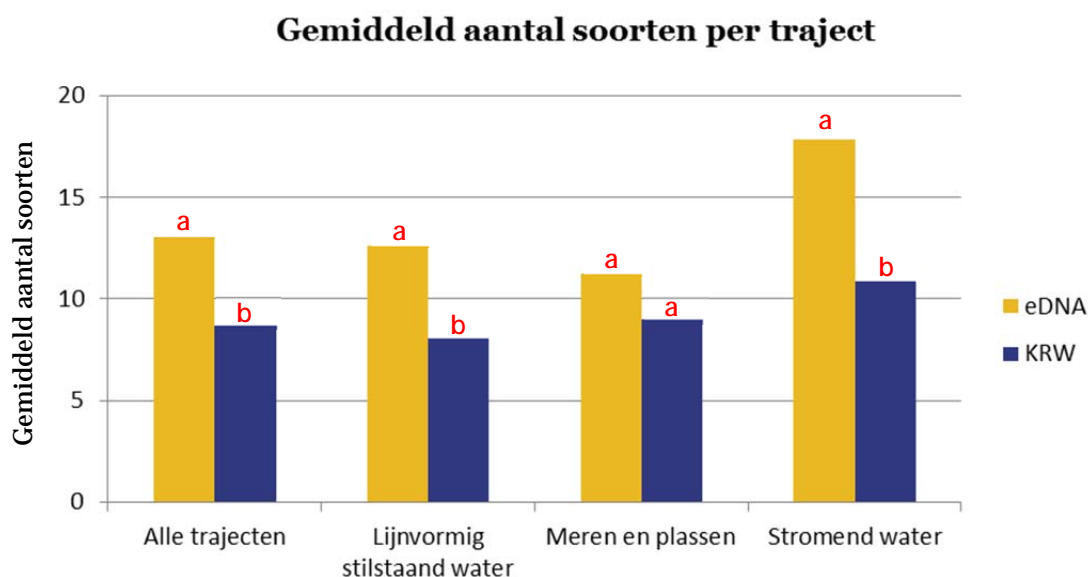
De PCR producten zijn samengevoegd en uitgelezen met behulp van een Next Generation Sequencer. Dit is een apparaat dat van elk DNA fragment de sequentie bepaald. Het bij elkaar voegen van de PCR producten van verschillende monsters is mogelijk doordat aan de gebruikte primers per monster verschillende “tags” zijn toegevoegd. Dit zijn korte stukjes DNA code. Op die manier kan achteraf gezien worden welk fragment bij welk monster hoorde, een vermeerderd fragment bestaat namelijk uit de primers met de tag en daarna de sequentie van de doelsoort.

De ruwe databestanden zijn geanalyseerd op de computer met het open source software pakket OBITOOLS (<http://metabarcoding.org/obitools>; Boyer et al., 2015). Allereerst zijn met het programma ILLUMINAPAIREDEND “forward en reverse reads” van hetzelfde DNA-molecuul samengevoegd. Vervolgens zijn met het programma NGSFILTER de primers en tags geïdentificeerd en zijn de sequenties toegewezen aan het juiste monster. Met het programma OBISPLIT zijn de gegevens van één run vervolgens opgesplitst in bestanden per monster. In de volgende stap zijn met het programma OBIUNIQ gelijke sequenties geclusterd. Hierna zijn met de programma's OBIGREP en OBICLEAN korte sequenties (kleiner dan 20 baseparen), sequenties die minder dan 100 keer voorkwamen en sequencing errors verwijderd. Tot slot zijn per monster de gevonden DNA-codes met het programma ECOTAG gematched aan een door RAVON en SPYGEN aangelegde databank. In deze databank zitten DNA-sequenties van 44 in Nederland verzamelde vissoorten (Herder et al., 2012) aangevuld met sequenties uit Frankrijk. Sequenties die niet in de eigen referentiedatabank gevonden konden worden zijn gematched in de online database Genbank. Alleen sequenties die een 98% match vormde zijn meegenomen (Ficetola et al., 2010). De uiteindelijke output is een betrouwbaar databestand met daarin het aantal gevonden sequenties (DNA-fragmenten) per soort.

3 Resultaten

3.1 Aantal soorten per traject: eDNA versus KRW-visbemonstering

Op de bemonsterde locaties zijn 43 vissoorten aangetroffen met eDNA tegenover 35 vissoorten in de KRW-visbemonstering. Gemiddeld over alle watertypen zijn er per traject 1,6 keer meer soorten gedetecteerd met één eDNA monster t.o.v. de KRW-visbemonstering op hetzelfde traject (figuur 2). In lijnvormige stilstaande wateren werden gemiddeld 1,6 keer meer soorten aangetroffen met eDNA, in meren en plassen gemiddeld 1,3 keer meer soorten en in stromend water gemiddeld 1,8 keer meer soorten. De gevonden verschillen waren sterk significant voor alle trajecten samen, lijnvormige stilstaande wateren en stromend water ($p < 0,001$, gepaarde T-test). Voor de meren en plassen was het gevonden verschil net niet significant ($p = 0,07$, gepaarde T-test). Van de 63 eDNA monsters (verzameld op 55 trajecten) werden in 54 monsters meer soorten aangetroffen met eDNA, in 6 monsters evenveel soorten en in 3 monsters minder soorten met eDNA dan in de KRW-visbemonstering (zie bijlage 1, tabel b).



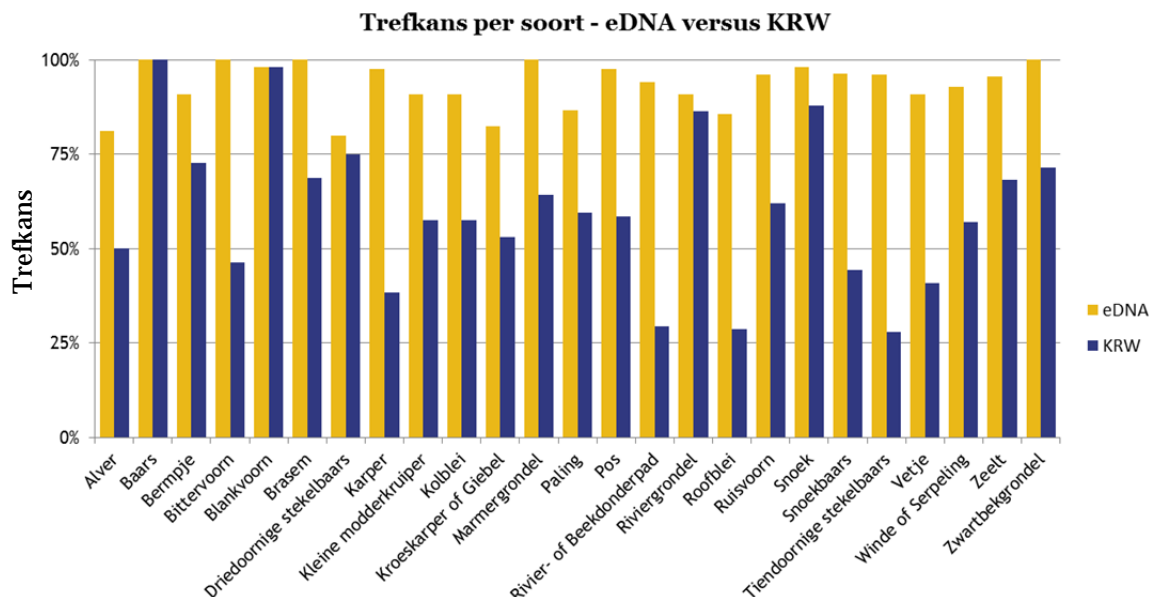
Figuur 2. Gemiddeld aantal aangetroffen soorten per traject op basis van een enkel monster met eDNA t.o.v. de KRW-visbemonstering op hetzelfde traject. Allereerst voor alle trajecten samen ($n=63$, significant verschil: $p < 0,001$), vervolgens per watertype: lijnvormig stilstaand water ($n=32$, significant verschil: $p < 0,001$), meren en plassen ($n=18$, geen significant verschil: $p=0,07$) en stromend water ($n=13$, significant verschil: $p < 0,001$). De a en b geven in de grafiek aan of het gevonden verschil significant was tussen twee balken (a en a = niet significant a en b = wel significant).

3.2 Trefkans per soort: eDNA versus KRW-visbemonstering

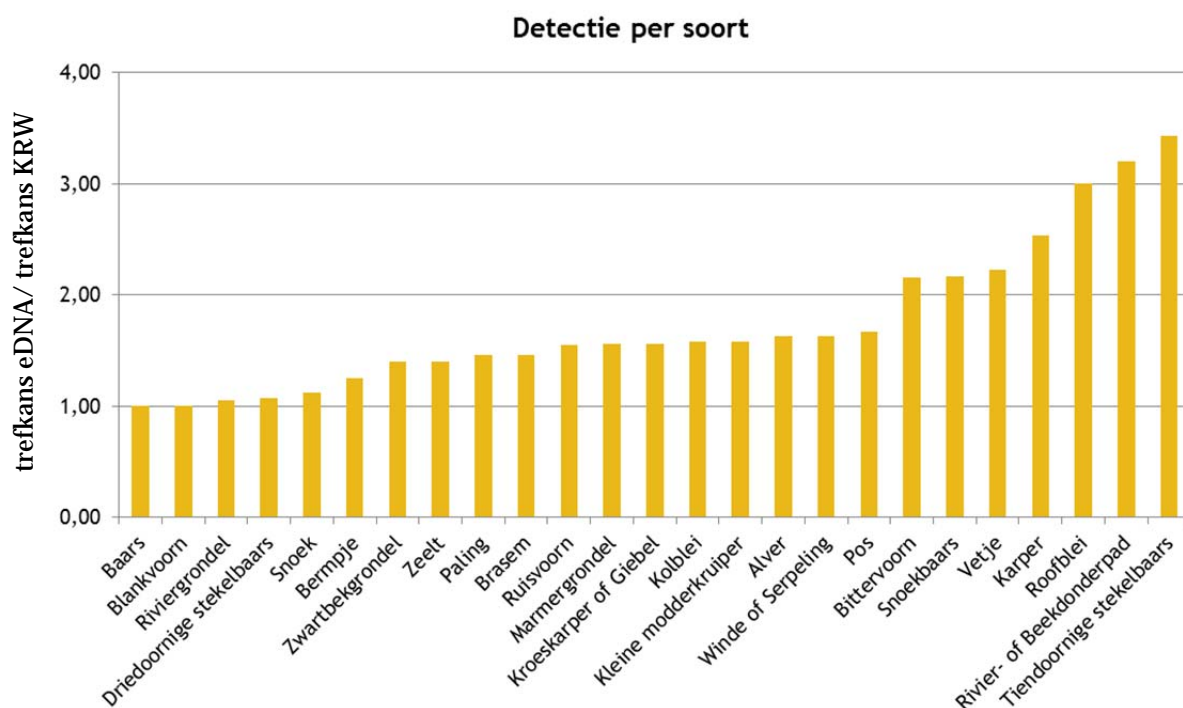
De trefkans per soort met eDNA en met de KRW-visbemonstering is weergegeven in figuur 3. Hiervoor zijn alleen de soorten meegenomen die op zeven of meer locaties voorkwamen (met eDNA en/of KRW aangetoond/gevangen). Vervolgens zijn de trefkans per methode berekend door per soort te kijken op hoeveel procent van de locaties waar de soort voorkomt, de soort ook is aangetoond met een methode (zie figuur 3). Hiernaast is de trefkans met eDNA gedeeld door de trefkans met de KRW-visbemonstering om de verschillen beter inzichtelijk te maken. Een score van 1 geeft een gelijke trefkans, een score hoger dan 1 staat voor een hogere trefkans met eDNA (zie figuur 4).

Voor de baars en blankvoorn hebben beide methoden een even hoge trefkans. Voor alle overige op meer dan 7 trajecten aangetroffen soorten (23 in totaal) is de trefkans met eDNA hoger dan die in de KRW-visbemonstering. Alle 23 soorten hadden met eDNA een trefkans van 75-100%. Bij de KRW-bemonstering gold dit voor vier soorten (baars, blankvoorn, riviergrondel en snoek). Met name de soorten alver, bittervoorn, karper, rivier/beekdonderpad, roofblei, snoekbaars, tiendoornige stekelbaars en vetje worden relatief vaak met de KRW-visbemonstering gemist (trefkans < 50%).

Het eDNA van grootkop-, zilver- of graskarper (soorten nog niet uit elkaar te halen op basis van eDNA door ontbreken in referentiedatabase) werd op 8 trajecten aangetroffen. Het gaat hierbij vermoedelijk voornamelijk om graskarper omdat deze soort wijd verspreid in Nederland voorkomt en de andere twee soorten alleen incidenteel worden aangetroffen. Zowel de graskarper als de andere soorten werden niet gevangen met de KRW-visbemonstering op deze trajecten. Grootkopkarper is wel gevangen op een niet met eDNA bemonsterd traject in het waterlichaam Midden- en Beneden Dommel.



Figuur 3. Trefkans per soort met eDNA en in de KRW-visbemonstering (per traject). Uitgedrukt als het percentage van alle trajecten waarop de soort met één van beide (eDNA en KRW-visbemonstering) is vastgesteld. In de grafiek zijn enkel soorten opgenomen die op 7 of meer locaties voorkwamen.



Figuur 4. Detectie per soort uitgedrukt als trekfskans met eDNA gedeeld door trekfskans met traditionele methoden (per traject). In de grafiek zijn enkel soorten opgenomen die op 7 of meer locaties voorkwamen. Een waarde van 1 staat voor gelijke trekfskans, een waarde van twee staat voor een tweemaal zo hoge trekfskans enz..

3.2.1 Percentage gemiste soorten met eDNA en de KRW-visbemonstering

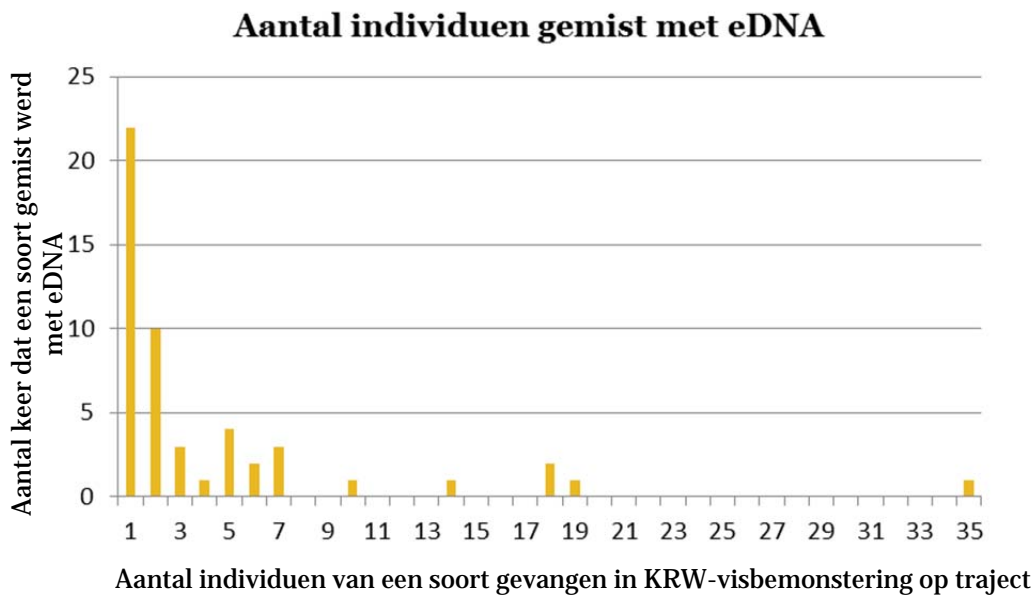
Gemist met eDNA

Op alle trajecten samen is 5,6% van de aanwezige vissoorten (soorten gevangen in de KRW) gemist met eDNA (43 keer op 774 soort-locatie combinaties, zie Bijlage 1 tabel c). Vervolgens is gekeken hoeveel individuen van een soort in de KRW-visbemonstering voorkwamen wanneer een soort gemist is met eDNA (figuur 5a). Hieruit komt naar voren dat soorten met name gemist worden wanneer ze in zeer lage dichtheden voorkomen op een traject. In maar 5 gevallen is een soort gemist wanneer meer dan 10 individuen gevangen werden op een locatie. Dit betrof twee maal de alver (14 en 18 individuen) en één keer de kolblei (18 individuen). Daarnaast werden de snoekbaars (19 individuen) en pos (35 individuen) in hogere aantallen gemist op traject Zoetermeerse plas 2 (hier lijkt iets mis te zijn gegaan in de eDNA bemonstering). Ook betrof het relatief vaak kleine soorten (bv driedoornige stekelbaars of vetje) of kleinere exemplaren van grotere soorten.

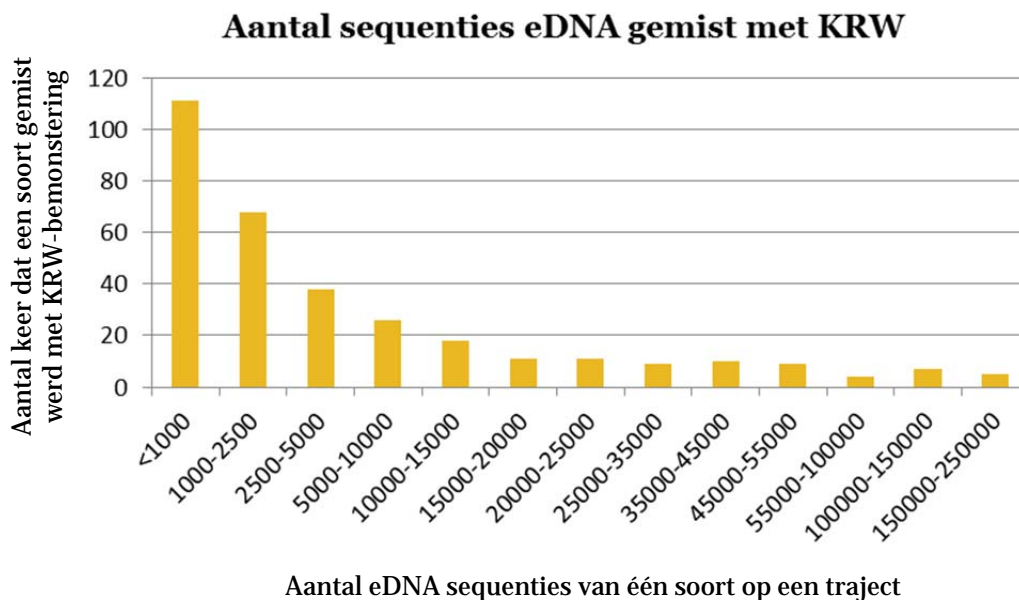
Gemist in de KRW-visbemonsteringen

Op alle trajecten samen is 37,9% van de aanwezige soorten gemist met de KRW-visbemonstering (293 keer op 774 soort-locatie combinaties, zie tabel Bijlage 1 tabel d). Vervolgens is gekeken hoeveel eDNA sequenties van een soort zijn gevonden op een traject wanneer een soort gemist is in de KRW (figuur 5b). Hieruit komt naar voren dat soorten met name gemist worden wanneer er weinig eDNA op het traject gevonden is. Toch zijn er ook een groot aantal keer soorten gemist waarvan zeer veel eDNA in het water aanwezig was. Gemiddeld zijn er per locatie in totaal 644.733 eDNA sequenties gevonden. Boven de 60.000 sequenties voor een gemiste soort gaat het dus gemiddeld om

een eDNA aandeel van 10% dat gemist wordt in de KRW-visbemonstering. Soorten waarvoor dat geldt zijn brasem (5x gemist), ruisvoorn (3x gemist), bittervoorn (2x gemist) en kleine modderkruiper, marmergrondel, roofblei, vetje en zeelt (allen 1x gemist)



Figuur 5a: Op de x-as staat het aantal individuen van één soort dat tijdens de KRW-bemonstering gevangen werd op een traject wanneer deze soort met eDNA gemist is. Op de y-as staat het aantal keer dat een soort gemist is met eDNA bij het betreffende aantal individuen in de KRW-visbemonstering. Het is dus 22 keer voorgekomen dat er 1 individu van een soort in de KRW is gevangen en de soort niet met eDNA werd aangetoond en 1 keer dat er 35 individuen aanwezig waren terwijl eDNA de soort niet detecteerde.

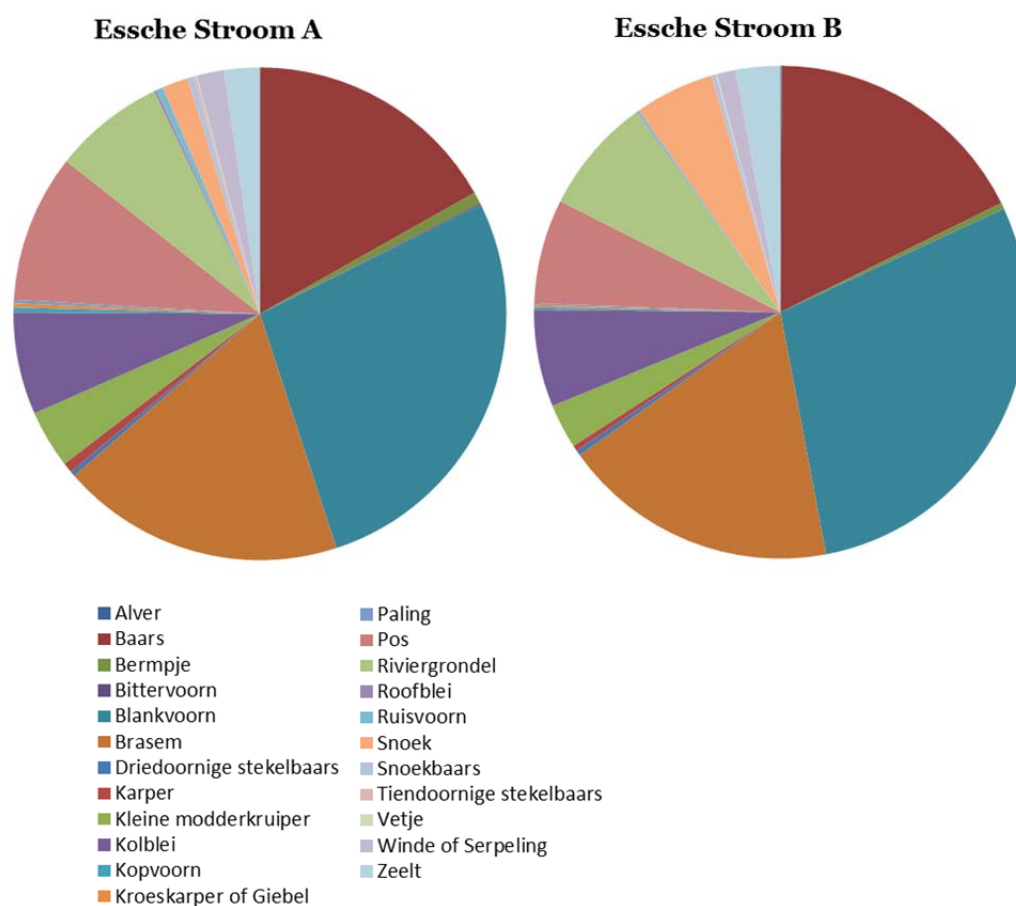


Figuur 5b: Op de x-as staat het aantal eDNA sequenties dat van één soort op een traject gevonden is wanneer deze soort in de KRW bevissing is gemist. Op de y-as staat het aantal keer dat een bepaald aantal individuen gemist is in de KRW bevissing. Let op, de klassen op de x-as zijn niet gelijk van grootte. Het is dus ruim honderd keer voorgekomen dat een soort in de KRW gemist werd terwijl er minder dan 1000 eDNA sequenties werden aangetroffen en slechts 5 keer wanneer er tussen de 150.000 en 250.000 eDNA sequenties van een soort werden gevonden op hetzelfde traject.

3.3 Reproduceerbaarheid eDNA metabarcoding

3.3.1 Vergelijking van herhaalde laboratoriumanalyse

Om inzicht te krijgen in de uniformiteit en reproduceerbaarheid van de laboratoriumanalyse is één monster uit de Essche Stroom (monster b) na de extractie tweemaal geanalyseerd. Hiermee is dus vergeleken of de eDNA metabarcoding analyse bestaande uit de PCRs (vermeerderen eDNA), sequencing (uitlezen DNA-codes) en bioinformatica (matchen sequenties aan soorten) uniform is. In figuur 6 staan de resultaten weergegeven als proportie van de DNA-sequenties per soort t.o.v. het gehele monster. De resultaten komen zeer goed overeen (R^2 van 0,979). Voor soorten waarvan veel eDNA in het monster zat geven beide analyses hetzelfde beeld. Voor de soorten waarvan weinig eDNA in de monsters zat zijn er kleine verschillen waarneembaar. Van de 23 gedetecteerde soorten zijn 21 soorten in beide analyses aangetroffen. Twee soorten zijn slechts in één van beide analyses aangetroffen (de alver met 503 DNA-sequenties in analyse A en de bittervoorn met 307 DNA-sequenties in analyse B).



Figuur 6: reproduceerbaarheid van de eDNA metabarcoding analyse (PCR, sequencing en bioinformatica). Een monster uit de Essche stroom is na extractie in duplo geanalyseerd (A en B). De figuren geven de aangetroffen proporties eDNA sequenties per soort weer.

3.3.2 Vergelijking van herhaalde monstername in het veld watermonsters

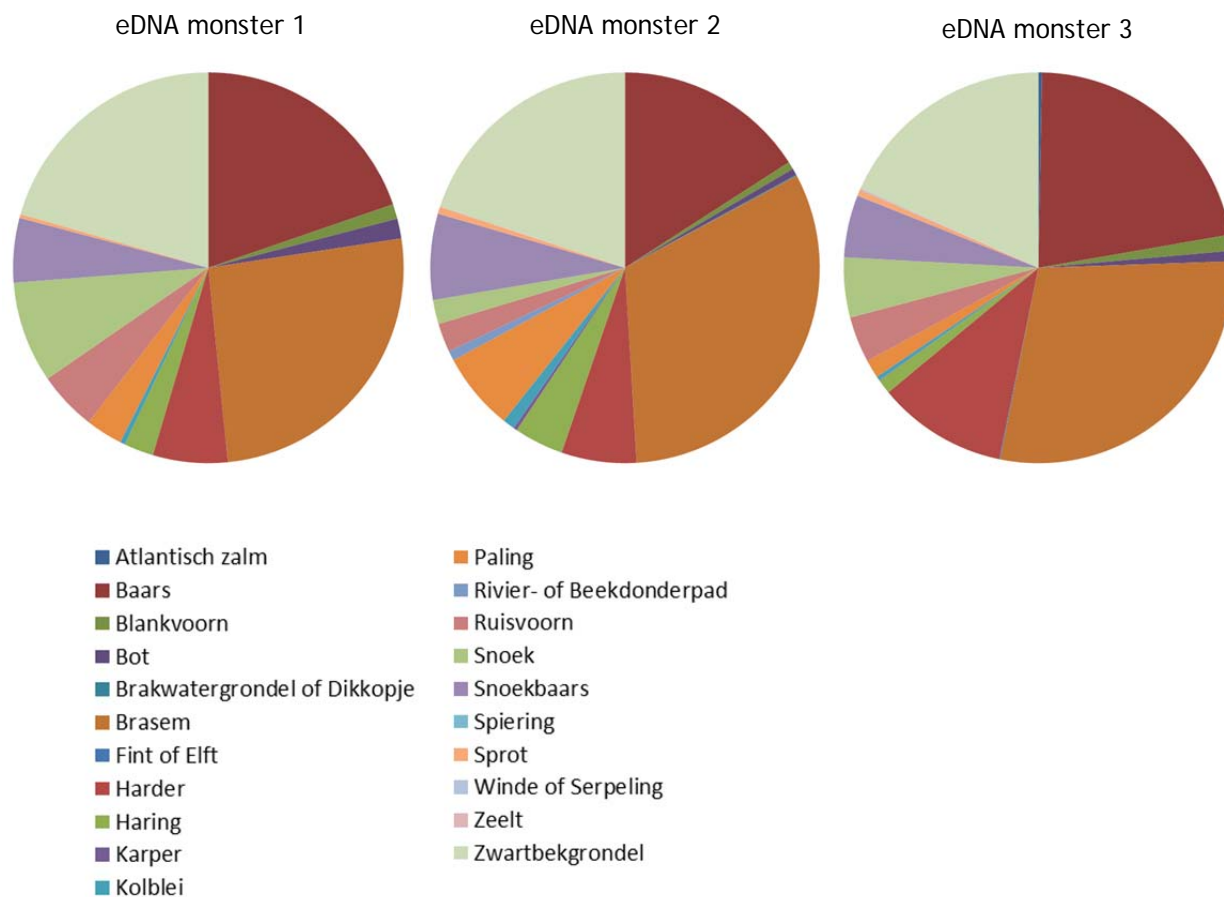
Om de reproduceerbaarheid van eDNA metabarcoding methode in het veld te bepalen zijn er in de Noorder IJplas (3 monsters), De Deelen (3 monsters), het Nannewijd (3 monsters) en de Essche Stroom (2 monsters) triplo- of duplomonsters op exact hetzelfde traject verzameld direct achter elkaar aan. Hiermee is dus vergeleken of de uitkomsten in termen van eDNA aandeel per soort met de gehanteerde monstermethode reproduceerbaar is. Middels lineaire regressie is paarsgewijs gekeken naar de correlatie tussen het aandeel eDNA per soort in de replica monsters. Een dergelijke correlatie wordt uitgedrukt als R-kwadraat (R^2) een waarde tussen de -1 en +1 waarbij een hoge R^2 aangeeft dat er een grote correlatie is (boven de 0,8 geeft aan dat er een zeer sterke correlatie is tussen de monsters). Er is daarnaast ook getest of deze correlatie significant was. De resultaten van deze analyses staan hieronder weergegeven in tabel 2, de bijbehorende grafieken zijn opgenomen in Bijlage 3. Tussen alle paarsgewijs vergeleken monsters was er een (sterke) significante correlatie op twee paarsgewijze vergelijkingen uit de Deelen na. Dit komt door 1 outlier (monster 3 bevatte veel eDNA van blankvoorn). In figuur 7 staan ter visualisatie de resultaten van één locatie, de Noorder IJplas, weergegeven als proportie van de DNA-sequenties per soort t.o.v. het gehele monster voor de drie replica monsters.

Tabel 2: correlatie tussen de verschillende paarsgewijs vergeleken replica monsters per traject. Gegeven zijn de R^2 (hoe hoger hoe beter de correlatie) en de p waarde (onder de 0,05 is de gevonden correlatie significant). De grafieken staan weergegeven in Bijlage 3.

Traject	Monster 1 vs 2		Monster 1 vs 3		Monster 2 vs 3	
	R2	P	R2	P	R2	P
Noorder IJplas	0,91	<0,001	0,96	<0,001	0,9	<0,001
De Deelen	0,60	0,008	0,05*	0,27*	0,24*	0,10*
Nannewijd	0,56	0,005	0,79	<0,001	0,62	0,002
Essche Stroom	0,95	<0,001	-	-	-	-

**) De slechte correlatie is hier veroorzaakt door één outlier in monster 3 (blankvoorn)*

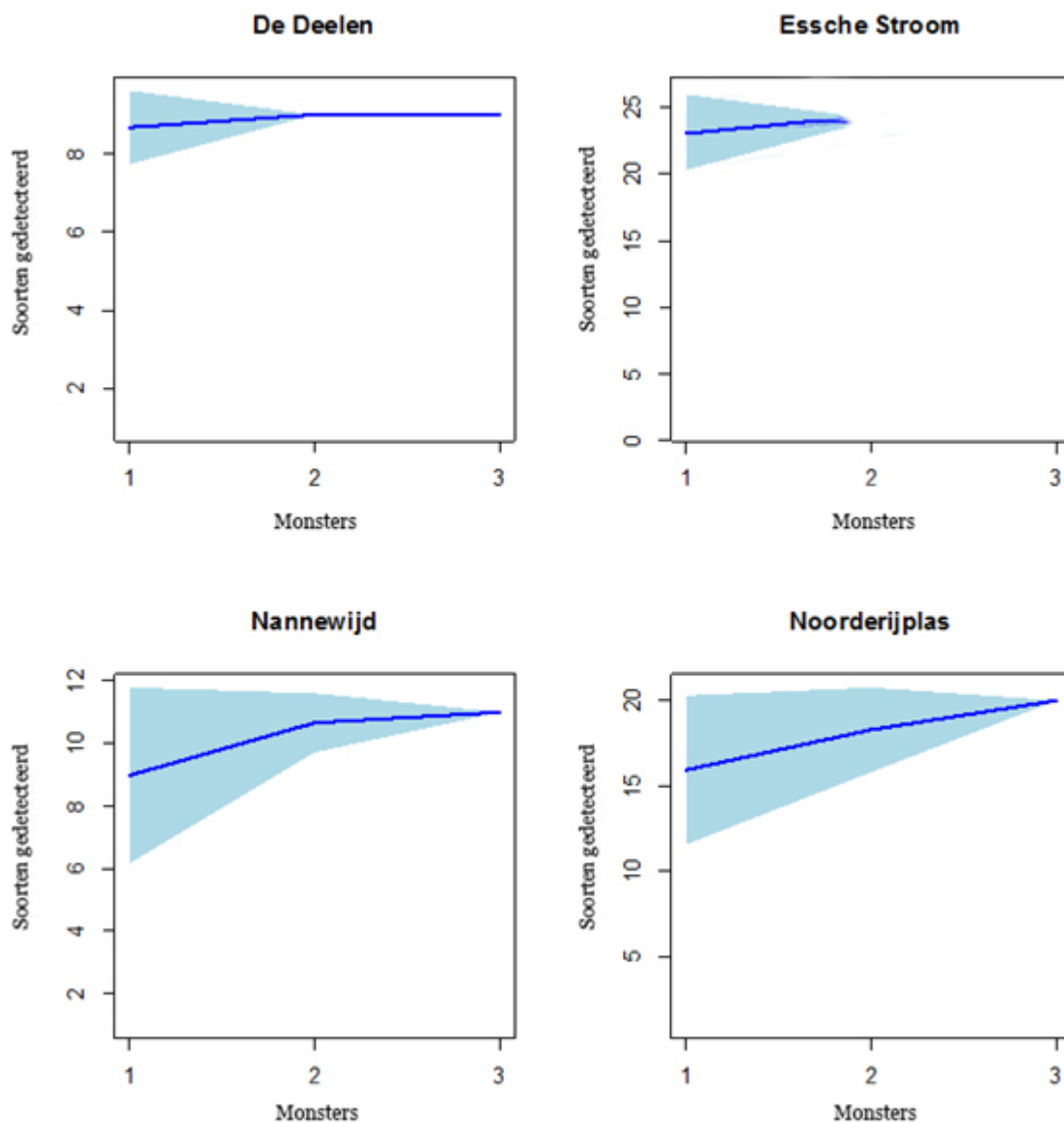
Noorder IJplas



Figuur 7: reproduceerbaarheid van de eDNA metabarcoding monsternamen in de Noorder IJplas. De figuren geven voor drie op hetzelfde traject verzamelde replica eDNA monsters de proporties eDNA sequenties per soort weer.

3.4 Benodigd aantal monsters voor soortdetectie

Op vier locaties zijn meerder eDNA-monsters verzameld op hetzelfde traject. In figuur 8 zijn voor deze 4 trajecten zogenaamde accumulatie-curves weergegeven voor de soortdetectie. Deze curves laten zien hoeveel het nemen van extra monsters bijdraagt aan het detecteren van meer soorten. Voor de Deelen en het Nanneveld vlakken de curves sterk af na twee monsters wat inhoudt dat het nemen van meer dan 2 monsters weinig toevoegt aan het aantal soorten. In de Essche Stroom zijn maar 2 replica's genomen en loopt de curve nog slechts licht op. In de Noorder IJplas loopt de curve na drie monsters nog steeds op wat inhoudt dat een extra monster naar verwachting nog steeds meer soorten zal toevoegen.

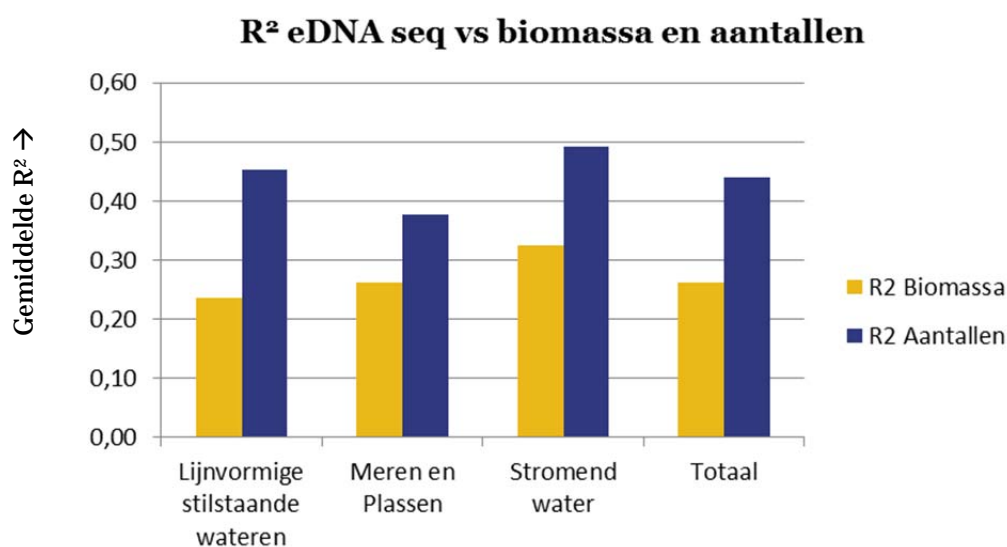


Figuur 8: accumulatie curves voor soortdetectie voor een viertal trajecten. De curve laat zien hoeveel nieuwe soorten een extra monster nog toevoegt. Wanneer de curve horizontaal loopt voegen meer monsters weinig meer toe aan het aantal soorten. Zo lang de curve oploopt voegen extra monsters nog wel extra soorten toe. Het blauw gearceerde gebied geeft de spreiding weer.

3.5 Correlatie tussen aandeel eDNA, biomassa en aantal per vissoort

Binnen vrijwel alle vismaatlaten is er een deelmaatlat abundantie met daarbinnen indicatoren gebaseerd op relatieve dichtheden of biomassa van bepaalde soortgroepen of specifieke soorten. Een nevendoeel van het onderzoek was daarom om inzicht te krijgen in de mogelijkheden voor kwantificering van de binnen een visgemeenschap aanwezige soorten middels eDNA. Dit is gedaan door te kijken naar de verhouding tussen de hoeveelheid DNA per soort in het monster en de in de KRW-visbemonstering gevangen aantallen en biomassa per soort. Hiervoor is per traject per soort het aandeel in eDNA sequenties, het aandeel in gevangen aantallen en het aandeel in biomassa berekend. Vervolgens is middels lineaire regressie gekeken naar de correlatie tussen het aandeel eDNA en aandeel in biomassa respectievelijk het aandeel in aantallen per soort in de KRW-visbemonstering. Een dergelijke correlatie wordt uitgedrukt als R-kwadraat (R^2 , de verklaarde variantie) een waarde tussen de -1 en +1 waarbij een hoge R^2 aangeeft dat er een grote correlatie is (boven de 0,8 geeft aan dat er een zeer sterke correlatie is tussen de onderzochte variabelen: de waarde van de 1e variabele is voorspellend voor de waarde van de 2e variabele). De correlatie tussen eDNA en de aantallen en dichtheden uit de KRW-visbemonstering is voor alle 63 onderzochte locaties bepaald. Op enkele locaties was de correlatie sterk ($R^2 > 0,9$) maar op veel locaties ook niet. Op locaties waar de correlatie slecht was kwam dit vaak doordat een groot aantal soorten niet was gevangen in de KRW-visbemonstering maar wel een aandeel had in het eDNA. Wat net als in de studie uit 2013 (Herder et al., 2014) zichtbaar was, was dat de algemeenste soorten vaak met beiden methoden een relatief groot percentage hebben en de zeldzame soorten met beide methoden een klein percentage hebben.

Figuur 9 geeft een overzicht van de gemiddelde R^2 waarden voor biomassa en aantallen voor de verschillende groepen van watertypen en alle watertypen gezamenlijk. Op basis van deze analyse lijkt er een betere correlatie te zijn tussen eDNA en aantallen dan tussen eDNA en biomassa. Hierbij dient nadrukkelijk vermeld te worden dat de gevonden waarden indicatief zijn doordat er een bias (afwijking t.o.v. werkelijkheid) zit in de resultaten van de KRW-visbemonstering per traject bekeken (zie verder discussie paragraaf 4.2).



Figuur 9: Gemiddelde correlatie (R^2) per watertype en voor het totaal tussen het aandeel eDNA sequenties per soort en het aandeel biomassa per soort (gele balken) en tussen het aandeel eDNA sequenties per soort en het aandeel in aantallen per soort (blauwe balken).

4 Discussie, aanbevelingen & conclusies

4.1 Bepaling soort samenstelling

4.1.1 Detectie van soorten met eDNA versus de KRW-visbemonstering

Er is op een groot aantal locaties en in een groot aantal watertypen aangetoond dat eDNA-metabarcoding een heel goed beeld geeft van de soort samenstelling van de visgemeenschap. Vrijwel op alle trajecten werden meer soorten met eDNA aangetroffen dan met de KRW-visbemonstering (gemiddeld 1,6 keer meer soorten). Alle soorten hadden met eDNA een trefkans van 75-100%. Met name de meer zeldzame soorten worden veel beter met eDNA gedetecteerd. Dit is reeds eerder gevonden in veel eDNA studies die zich op de detectie van een enkele soort richten (zie overzicht in Rees et al., 2014 en Herder et al., 2014a).

In meren en plassen werd met eDNA-metabarcoding gemiddeld 1,3 keer meer soorten gedetecteerd (net niet significant, $p=0,07$), in lijnvormige stilstaande wateren 1,6 keer meer soorten en in stromende wateren 1,8 keer meer soorten. Dat het verschil het grootst is in stromende wateren kan op twee manieren verklaard worden. Allereerst zijn stromende wateren gemiddeld genomen soortenrijker dan lijnvormige stilstaande wateren, meren en plassen en komen er relatief gezien meer zeldzame soorten voor. Hiernaast is in stromende wateren de kans groter, dan in stilstaande wateren, dat met eDNA-metabarcoding soorten gedetecteerd worden die niet op het traject zelf aanwezig waren maar net bovenstrooms van het traject. Onderzoek heeft uitgewezen dat eDNA in stromend water stroomafwaarts van de bron tot één a twee kilometer afstand gedetecteerd kan worden (Civade et al., in press). In onderhavige studie is voor dit effect gecorrigeerd: de soorten waarvan zeer weinig DNA sequenties zijn aangetroffen in de monsters, zijn er bioinformatisch uit gefilterd. De verwachting is daarom dat in onderhavige studie hoofdzakelijk soorten uit het traject zelf of uit de directe nabijheid ervan gedetecteerd zijn.

4.1.2 Trefkans per soort

Uit de resultaten blijkt dat de trefkans met eDNA voor alle soorten die op meer dan zeven locaties voorkwamen even hoog (2 soorten) of hoger (23 soorten) was dan de trefkans in de KRW-visbemonstering. De trefkans met eDNA lag voor alle soorten die op meer dan 7 trajecten voorkwamen boven de 75% en voor de meeste soorten boven de 90%. Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat bepaalde soorten slechter gedetecteerd worden met eDNA. Hierbij dient de kanttekening te worden geplaatst dat de trefkans afgeleid wordt uit de vangsten uit de KRW-bevissing die geen compleet beeld geeft. Het is waarschijnlijk dat er ook soorten met beide methoden zijn gemist op trajecten, wat de trefkans met eDNA dan iets zou verlagen. Wanneer een soort gemist werd met de eDNA methode, maar wel werd gevangen in de KRW-visbemonstering, werden er doorgaans zeer weinig individuen gevangen (figuur 5). Dit impliceert dat eDNA nagenoeg alleen soorten die in zeer lage dichtheden voorkomen mist.

Soorten die meer dan twee keer beter gedetecteerd werden met eDNA ten opzichte van de KRW-visbemonstering, waren een aantal kleinere soorten: bittervoorn, vetje rivier-of beekdonderpad en tiendoornige stekelbaars en een aantal grotere soorten: snoekbaars, karper, graskarper en roofblei. Voor de kleinere soorten geldt dat ze waarschijnlijk moeilijker te vangen zijn met netten als de kuil en de zegen doordat ze zich vooral in de oeverzone ophouden, met electrovissen worden ze door hun geringe afmeting sneller gemist (hoe kleiner de vis hoe minder sterk deze reageert op het elektrisch veld). Voor Rivier- of beekdonderpad geldt hiernaast dat ze op de bodem in holten (vaak onder stenen) leven en geen zwemblaas hebben, waardoor ze bij electrovissen minder goed naar het oppervlak komen. Voor grote vissoorten als de karper, graskarper en roofblei geldt dat volwassen exemplaren van deze soorten alert en snel zijn en daarom waarschijnlijk vaak weten te ontsnappen aan een visbemonstering met netten of electrovisserij. Voor de snoekbaars geldt dat deze soort lichtschuw is en zich in helderdere wateren veelal enkel 's nachts waagt in de ondiepere delen van een waterlichaam, en hier daardoor minder vaak gevangen worden.

4.1.3 Onverwachte soorten met eDNA-metabarcoding

Er is een grondige validatie uitgevoerd op alle met eDNA-metabarcoding gedetecteerde soorten. Dit is gedaan op basis van de volgende punten:

- Vangsten in de KRW-bevissing (op zelfde traject en op waterlichaam niveau).
- Verspreiding op basis van de Nationale Databank Flora en Fauna.
- Habitatieisen van de soorten.

Van de 843 soort detecties met eDNA verdeeld over de 55 locaties betrof 99% soorten die ook gevangen werden of op basis van hun verspreiding en habitat verwacht konden worden op het betreffende traject. In bijlage 2 staan de onverwachte detecties per soort individueel beschreven. Enkele soorten waren nog niet bekend uit een gebied maar hun daadwerkelijk voorkomen bleek plausibel na navraag.

Daarnaast zijn enkele opvallende eDNA detecties gedaan van soorten die op de betreffende locaties nagenoeg zeker niet levend voorkomen. Daarbij gaat het enerzijds om soorten die door mensen geconsumeerd worden zoals Atlantische zalm en regenboogforel. Anderzijds gaat het om soorten zoals horsmakreel, Europese sardine en makreel die naast consumptie ook veel worden gebruikt in de sportvisserij als aasvis voor het vissen op snoek en snoekbaars. Tot slot is er in de stadsgracht van Den Haag eDNA aangetroffen van *Cichlide* sp., dit kan restanten van geconsumeerde Tilapia betreffen maar mogelijk ook afkomstig zijn van dieren die in aquaria gehouden worden en die zijn uitgezet of van DNA uit aquariumwater dat in de gracht is geloosd (zie het overzicht in Bijlage 2).

De resultaten uit dit onderzoek maken het aannemelijk dat menselijke consumptie van vis en of gebruik van aasvissen leiden tot de detectie van deze soorten met eDNA detectie in het betreffende water. Belangrijk om op te merken is dat in de gevallen dat het zeer aannemelijk is dat eDNA via één van deze manieren in het water terecht is gekomen, de hoeveelheid gedetecteerde eDNA sequenties zeer laag was (variërend van 117 sequenties tot 1561 sequenties). Dat biedt mogelijkheden om dergelijke detecties bioinformatisch te filteren door de drempelwaarde voor het aantal sequenties waarbij een soort wordt meegenomen te verhogen. Wanneer een soort die drempelwaarde niet haalt kan de

detectie dan met de nodige nuancering gebracht worden. Dit dient ook voor andere soorten gedaan te worden die veel gegeten worden (paling, snoekbaars) of regelmatig als aasvis worden gebruikt (spiering).

4.1.4 Soorten die nog niet geïdentificeerd kunnen worden met eDNA

Er zijn vier redenen aan te wijzen waarom soorten op dit moment nog niet (tot op soort) geïdentificeerd kunnen worden met eDNA metabarcoding:

1. Soorten ontbreken in de referentiedatabases
2. Nauwverwante soorten ontbreken in de referentie database
3. Nauwverwante soorten met gelijke DNA-sequenties voor het vermeerderde fragment
4. Er zijn verschillende vormen van één soort

Soorten ontbreken in de referentiedatabases

Voor de soorten die nog ontbreken in de DNA-referentiedatabase is het mogelijk dat deze soorten wel in het eDNA monster zaten en vermeerderd zijn in de analyse maar niet gematched konden worden. Dit geldt bijvoorbeeld voor de spiering die is aangetoond op enkele locaties in de KRW-visbemonstering. Daarnaast geldt dat voor een aantal mariene soorten die aangetoond hadden kunnen worden op de brakke locaties. Zodra deze soorten zijn toegevoegd aan de referentiedatabase kan eventueel opnieuw gekeken worden of hun sequenties in de eDNA-monsters zijn aangetroffen en dan zou het aantal met eDNA-metabarcoding gedetecteerde soorten dus nog iets kunnen toenemen. Van

Nauwverwante soorten ontbreken in de referentie databases

Wanneer van nauwverwante soorten slechts één van beide soorten in de referentiedatabase voorkomt levert dit problemen op. Een eDNA fragment zal dan namelijk worden toegerekend aan de soort die in de referentiedatabase zit terwijl het in theorie mogelijk is dat de nauwverwante soort dezelfde DNA sequentie heeft voor het vermeerderde fragment. De soorten worden daardoor gegroepeerd weergegeven. Dit geldt bijvoorbeeld voor Elft en Fint, beide soorten uit het geslacht *Alosa*. De fint zit in de referentiedatabase maar de elft niet, doordat de DNA-sequentie van de elft niet bekend is wordt er voor de veiligheid voor gekozen om de sequenties toe te kennen aan fint/elft. Wanneer het DNA van ontbrekende soorten wordt toegevoegd kan gekeken worden of ze te onderscheiden zijn van hun nauwverwante soorten of niet.

Nauwverwante soorten met gelijke DNA-sequenties

Enkele nauwverwante soorten hebben een 100 procent identieke sequentie op het door de primers vermeerderde DNA fragment. De gebruikte primers vermeerderen een kort fragment van 95 basenparen op het 12S gen. Met enkel gebruik van deze primers zullen deze soorten dus nooit van elkaar kunnen worden onderscheiden. Momenteel wordt er echter gewerkt aan het ontwikkelen van additionele primers die zich op een ander fragment richten waarop een deel van de soorten wel te onderscheiden is. Door het gelijktijdig gebruiken van beide primersets zal daardoor een nog groter deel van de soorten te onderscheiden zijn. De werking van deze additionele primers zal dit jaar gevalideerd worden.

Verschillende vormen van één soort

Enkele soorten worden soms als verschillende “soorten” beschouwd terwijl ze feitelijk verschillende vormen van dezelfde soort betreffen. Dit geldt voor de beekforel en zeeforel

en ook voor de beekprik en rivierprik. Doordat deze “soorten” feitelijk tot dezelfde soort behoren zijn ze op basis van eDNA niet van elkaar te onderscheiden. Op basis van het watertype dat bemonsterd is, is het vaak wel mogelijk om de vorm vast te stellen. Zo komen beekforel en beekprik in Nederland alleen in bepaalde beken voor terwijl zeeforel en rivierprik (op enkele locaties na) hoofdzakelijk in de grotere rivieren en op zee worden aangetroffen.

Tabel 3 geeft een overzicht van soorten die op moment van schrijven nog niet tot op soort geïdentificeerd konden worden met de achterliggende reden.

Tabel 3: soorten die momenteel niet tot op soort geïdentificeerd kunnen worden. Te onderscheiden zijn soorten die ontbreken in de referentiedatabase, soorten waarvan nauwverwante soorten ontbreken in de referentiedatabase, soorten die een identieke DNA-sequentie hebben op het door de primers vermeerderde DNA-fragment en “soorten” die eigenlijk tot één enkele soort behoren.

Ontbreekt in referentie database	Nauwverwante soort Ontbreekt in referentiedatabase	Identiek DNA op fragment	Behoort tot één soort
Spiering	Kroeskarper en Giebel	Rivier- en beekdonderpad	Beek- en Rivierprik
	Grootkop- gras- en Zilverkarper	Winde en Serpeling	Beek- en Zeeforel
	Fint en Elft		
	Brakwatergrondel en Dikkopje		

4.2 Correlatie tussen aandeel eDNA, biomassa en aantal per vissoort

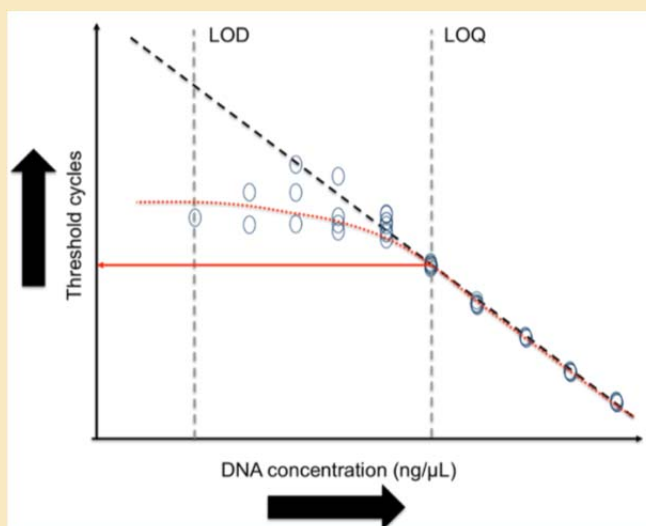
In paragraaf 3.5 zijn de resultaten besproken van een lineaire regressie analyse waarbij de correlatie bepaald is van de hoeveelheid eDNA sequenties binnen een traject van een soort met het aandeel in de aantallen respectievelijk in de biomassa binnen de KRW-visbemonstering in het betreffende traject. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de KRW-bevissing is opgezet om beeld te geven van de visstand op waterlichaamniveau en niet op trajectniveau. Door het beperkte aantal eDNA monsters kon echter geen vergelijking gemaakt worden op waterlichaamniveau. De gevonden correlaties varieerde tussen trajecten. Er waren trajecten met een hoge correlatie en een lage correlatie tussen de hoeveelheid eDNA sequenties en de aantallen respectievelijk in de biomassa binnen de KRW-visbemonstering. Gemiddeld genomen was het verband matig waarbij de correlatie tussen eDNA en vangstaantallen ($R^2=0,44$). sterker was dan het verband tussen eDNA en biomassa ($R^2=0,26$). Deze sterkere relatie kan mogelijk verklaard worden doordat bij hogere aantallen individuen de kans toeneemt dat er in de buurt van een individu gemonsterd is met eDNA. Bij een hoge biomassa kan het ook gaan om een relatief beperkt aantal grote individuen waarbij de kans minder groot is dat er in de buurt van een individu gemonsterd wordt.

Voor het gebruik van eDNA bij het bepalen van kwantitatieve visindicatoren is het belangrijk dat er een representatief beeld verkregen kan worden van de aanwezige aantallen en/of de biomassa van vissoorten in een waterlichaam. Op basis van de uitkomsten uit de onderhavige studie en uit andere studies lijken de mogelijkheden met eDNA metabarcoding hiervoor aanwezig. In aquaria en mesocosm experimenten is een correlatie aangetoond tussen de hoeveelheid eDNA en de aantallen/biomassa van amfibieën en vissen (Thomsen et al., 2012b; Takahara et al., 2012). De eDNA concentraties liggen in dergelijke opstellingen echter vele malen hoger dan in het veld doordat de dieren in een beperkt watervolume leven, dat niet ververst wordt en er weinig afbraak is van micro-organismen. Treguier et al. (2014) hebben vastgesteld dat er een limiet is aan de laagste concentratie eDNA die nog betrouwbaar te kwantificeren is. In het veld blijkt de zogenaamde Limit of Quantification niet gehaald te worden voor soorten die in lagere dichtheden voorkomen (zie kader 2). Dit betekent dat deze niet betrouwbaar gekwantificeerd kunnen worden. Ook voor de visbemonstering met netten geldt overigens dat van soorten die in lage dichtheid voorkomen geen betrouwbare aantalsschatting of biomassa schatting gemaakt kan worden.

Kader 2 - Limit of Quantification eDNA

In het veld wordt eDNA verdunt, afgebroken en kan het binden aan organisch materiaal. Doordat PCR een stochastisch proces is wanneer eDNA in lage concentraties voorkomt is dit niet betrouwbaar te kwantificeren. Wanneer de primers namelijk reeds in de eerste cycli van de PCR binden geeft dat een hele andere uitkomst dan dat ze pas een paar cycli later binden. Trequier et al (2014) hebben dat laten zien in onderstaande figuur. Hierin geven ze een Limit of Detection (LOD): de laagste concentratie eDNA die nog te detecteren is en een Limit of Quantification (LOQ): de laagste concentratie eDNA die nog betrouwbaar is te kwantificeren. In het veld blijkt de Limit of Quantification zelden gehaald te worden, zeker niet voor soorten die in lage dichtheden voorkomen. Dit betekent dat deze niet betrouwbaar gekwantificeerd kunnen worden. Wel is het mogelijk om relatieve verhoudingen tussen soorten te geven in de orde van zeer lage dichtheid, lage dichtheid, medium dichtheid, hoge dichtheid etc. Dit blijkt ook uit vergelijkingen in eerdere onderzoeken (Herder et al., 2014b).

Kwantificatielimiet (LOQ) en detectielimiet (LOD). De zwarte stippellijn komt overeen met de theoretische correlatie tussen de drempelcyclus (Ct: het aantal PCR cycli totdat fluorescerend signaal zichtbaar wordt) en de DNA concentratie. De rode stippellijn komt overeen met de werkelijk gevonden correlatie tussen de qPCR drempelcyclus en de DNA concentratie. De rode horizontale lijn indiceert de drempelcyclus waarboven de resultaten niet als kwantitatief geïnterpreteerd mogen worden (Trequier et al., 2014).



4.3 Reproduceerbaarheid eDNA metabarcoding

Voor de betrouwbaarheid van de eDNA methode is het onder andere van belang dat de uitkomsten van laboratorium analyses van eenzelfde watermonster vergelijkbaar zijn en dat verschillende watermonsters op dezelfde plaats een vergelijkbare uitkomst geven.

Vergelijkbaarheid herhaalde analyses van een watermonster

Om de betrouwbaarheid van de analyse te testen zijn op één monster twee analyses uitgevoerd. Hoewel dit een kleine steekproef betreft waren de resultaten bemoedigend: het totaal aantal soorten (21) en de verhouding tussen de hoeveelheid eDNA was nagenoeg gelijk (figuur 6). Dit laat zien dat er tijdens de analyse geen bias optreedt. Twee soorten werden echter slechts in één van beide analyses gedetecteerd. Van deze soorten werd een zeer lage hoeveelheid eDNA aangetroffen. Dit onderstreept het belang van het grote aantal PCR replica's voor het verkrijgen van een nauwkeurig beeld (Ficetola et al., 2014). In dit onderzoek zijn 12 PCR replica's per analyse uitgevoerd maar dat bleek toch nog te weinig voor het detecteren van alle soorten in het monster. De vraag is in hoeverre dit in de praktijk een probleem zal zijn. Ook in de huidige KRW-vismonitoring worden soorten die in lage dichtheden voorkomen gemist omdat ze niet gevangen worden, of over het hoofd gezien bij het determineren. Bij het opstellen van de deelmaatlat soortsaanstelling is hier rekening mee gehouden.

Vergelijkbaarheid herhaalde watermonsters binnen een traject

Om te testen in hoeverre verschillende watermonsters binnen exact hetzelfde traject een vergelijkbare uitkomst geven zijn op vier trajecten meerdere watermonsters genomen en geanalyseerd. De drie monsters in de Noorder IJplas (figuur 7) en de twee monsters uit de Essche stroom gaven nagenoeg dezelfde uitkomst qua aandeel eDNA per soort. De drie monsters uit het Nanneveld en twee van de drie monsters uit de Deelen gaven ook een vergelijkbaar beeld, zij het net iets minder sterk. In de Deelen werd een zwakke correlatie gevonden. Dit kwam doordat het derde monster afweek van de twee andere monsters. Dit bleek te komen doordat hierin, ten opzichte van de andere twee monsters, een relatief grote hoeveelheid eDNA van de blankvoorn aanwezig was. Mogelijk is dit monster bij toeval precies in de buurt van een (school) blankvoorn verzameld, of is er een stuk weefsel van blankvoorn in het monster terecht gekomen. Om dit soort effecten uit te middelen is het belangrijk om voldoende monsters binnen een waterlichaam te verzamelen.

Op basis van de grote mate van vergelijkbaarheid tussen de meeste monsters kan geconcludeerd worden dat de eDNA metabarcoding methode een goede potentie heeft voor het semi-kwantitatief in beeld brengen van visgemeenschappen.

4.4 Benodigd aantal monsters voor soortdetectie

Op basis van de vier locaties waar replicamonsters genomen zijn is bepaald in hoeverre extra eDNA monsters zorgen voor het aantreffen van nieuwe soorten (zie accumulatie-cuves figuur 8). Voor de Deelen, Essche Stroom en het Nanneveld blijken er bij drie monsters nauwelijks meer nieuwe soorten te worden aangetroffen, wat inhoudt dat het nemen van meer dan 2 monsters op één traject weinig toevoegt aan het aantal soorten. In de Noorder IJplas worden er na drie monsters nog steeds nieuwe soorten aangetroffen, hetgeen erop duidt dat er bij het nemen van meer monsters naar verwachting nog meer soorten gevonden zullen worden.

De Deelen betreft een kleiner water waardoor het te verwachten is dat met relatief weinig monsters een compleet beeld van de soortsamstelling verkregen kan worden. Het Nanneveld betreft een groot stilstaand water met een gemiddeld aantal soorten. De Essche Stroom betreft een stromend en zeer soortenrijk water. De Noorder IJplas betreft een groot, zeer soortenrijk stilstaand water dat in verbinding staat met het Noordzeekanaal en daardoor een brakke onderlaag heeft (hierdoor komen er zowel zoete als mariene soorten voor).

In stromende niet al te brede wateren is het vaak zo dat verschillende habitats met verschillende vissoorten zich relatief dicht bij elkaar bevinden (bijvoorbeeld oever & stroomgeul) waarbij de stroming mogelijk bijdraagt aan een goede mening van eDNA in het water waardoor de detectiekans groter is. In grotere en diepere plassen zullen de verschillende habitats vaak verder uit elkaar liggen en is de menging door het ontbreken van stroming waarschijnlijk ook minder. In de Noorder IJplas ligt het nog gecompliceerder met een brak tot zoute onderlaag en zoete bovenlaag met daarin verschillende soorten. Dit verklaart mogelijk waarom er in de Noorder IJplas meer monsters nodig zijn om alle aanwezige soorten te detecteren.

In dit onderzoek is per locatie één monstermethode ingezet (filter met zak of filter met pomp). De opzet was er niet op gericht om de efficiëntie van beide methoden te vergelijken. Het gemiddeld aantal soorten per traject per methode is niet bruikbaar omdat dit sterk beïnvloedt wordt door de bemonsterde wateren. De filter met pomp is namelijk vaker ingezet in soortenrijkere wateren (grote wateren, stromende wateren).

4.5 Conclusies

- De eDNA-methode kan voor goed worden ingezet voor het bepalen van de soortsaamenstelling. Gemiddeld werden er 1,6 keer meer soorten gedetecteerd per traject met eDNA dan met de KRW-visbemonstering op dezelfde trajecten (paragraaf 4.1.1).
- De trefkans met eDNA lag voor de 25 soorten die op meer dan 7 locaties voorkwamen boven de 75% en veelal boven de 90% (paragraaf 3.2).
- In een beperkt aantal gevallen werden met eDNA barcoding soorten gemist, het ging hoofdzakelijk om soorten die in zeer lage dichtheden op het betreffende traject werden aangetroffen (paragraaf 4.1.2).
- In dit onderzoek is aangetoond dat de eDNA methode zo gevoelig is dat ook restanten van geconsumeerde vissen en/of als aasvis gebruikte soorten gedetecteerd kunnen worden. De hoeveelheid gedetecteerd eDNA van deze soorten is in de regel zeer laag waardoor ze eventueel middels het toepassen van een drempelwaarde buiten de resultaten gehouden kunnen worden (paragraaf 4.1.3).
- Met eDNA-metabarcoding is het in enkele gevallen nog niet mogelijk om tot op soort te identificeren, voor een deel van de gevallen is de verwachting dat dat in de toekomst wel kan (paragraaf 4.1.4 en 4.1.5).
- De eDNA-metabarcoding methode bleek in hoge mate reproduceerbaar, zowel de analyse als de monsternamen (paragraaf 3.3). Dit geeft aan dat er middels eDNA in potentie een nauwkeurig beeld verkregen kan worden van de verhouding tussen de DNA-sequenties van de aanwezige soorten in een water.
- Er bleek een grote mate van overeenkomst in de verhoudingen tussen de hoeveelheid aangetroffen eDNA per soort op de trajecten waarbinnen meerdere eDNA monsters genomen werden (paragraaf 3.5). Dit wijst erop dat de methode in potentie geschikt is voor het bepalen van semi-kwantitatieve visgemeenschapsindicatoren.
- Met de gehanteerde opzet bleek het niet goed mogelijk om de eDNA verhoudingen binnen een traject te vergelijken met de hier aangetroffen aantallen en biomassa in de KRW-visbemonsteringen.

5 Hoe verder

5.1 Onderzoekstraject, ideeën voor een maatlat

Het doel van het onderzoekstraject dat RAVON in 2013 gestart is, is onderzoeken of eDNA metabarcoding een goed alternatief is voor de huidige KRW-visbemonsteringen. Op basis van de resultaten uit deze studie en die uit internationale studies blijkt eDNA metabarcoding een goede methode te zijn voor het bepalen van de soortsaamenstelling in een water en in potentie ook geschikt voor het bepalen van semi-kwantitatieve visgemeenschapsindicatoren gebaseerd op de mate van algemeenheid van bepaalde soorten of soortgroepen.

Een daadwerkelijke implementatie van eDNA metabarcoding als bemonsteringsmethodiek voor het bepalen van visindicatoren en ecologische scores voor de KRW zal meerdere jaren in beslag nemen. Dit vraagt om de uitvoering van de volgende zaken:

- Vaststellen meetprotocollen voor verschillende watertypen
- Vervolgonderzoek kwantificering
- Verscherpen bioinformatische filters
- Uitbreiden referentiedatabase
- Vaststellen referentiesituaties, aanpassen vissenmaatlaten en interkalibratie
- Implementatie bij Nederlandse laboratoria

Het is hierbij op termijn wenselijk om een (internationale) projectgroep samen te stellen van (vis)specialisten op het gebied van verschillende watertypen en experts op het gebied van environmental DNA, data-analyses en statistische toetsing. Hieronder worden de te nemen vervolgstappen nader uitgewerkt.

Vervolgonderzoek benodigd aantal monsters

In het kader van onderhavige studie zijn de resultaten van eDNA-metabarcoding per traject vergeleken met de resultaten van de KRW-visbemonstering. Voor een accurate monitoring met eDNA-metabarcoding van een waterlichaam dient bepaald te worden op welke manier en hoeveel eDNA monsters er verzameld dienen te worden in een waterlichaam van een bepaald watertype rekening houdend met kenmerken als stroming, habitatdiversiteit, diepte en grootte.

Vervolgonderzoek kwantificering

De relatie tussen biomassa en of aantallen vissen en de hoeveelheid eDNA is reeds in een aantal studies onderzocht. In aquarium- en mesocosmexperimenten is deze relatie meerdere malen aangetoond middels soortspecifieke benadering met qPCR (o.a. Thomsen et al., 2012b; Takahara et al., 2012 en Klymus et al., 2015) en middels eDNA-metabarcoding (Evans et al., 2015). Daarnaast zijn er beschrijvende studies uit het veld waarbij de precieze biomassa/aantallen van soorten op een locatie niet bekend waren (onderhavige studie, Takahara et al., 2012). SPYGEN en het INBO in Vlaanderen hebben een studie uitgevoerd met visvijvers waaruit de daadwerkelijke biomassa en aantallen vissen bekend was. In deze studie zijn dezelfde primers en protocollen gebruikt als in

onderhavige studie. In deze studie is voor de meeste soorten een goede correlatie gevonden tussen eDNA en biomassa (pers. med. INBO).

Voor het bepalen van kwantitatieve visgemeenschapsindicatoren, zoals die van de KRW-maatlatten, is extra onderzoek nodig om de relatie tussen de hoeveelheid gedetecteerd eDNA en het aanwezige aandeel in biomassa en aantallen per vissoort in verschillende watertypen met verschillende visstandssamenstellingen te bepalen. Het gaat hierbij om een combinatie van veld- en experimenteel onderzoek (zie paragraaf 4.2 voor de aanbevelingen). Hierbij dient onder andere gekeken te worden naar soortspecifieke verschillen (laten bepaalde soorten meer eDNA achter dan anderen) en mogelijke soortspecifieke bias in de PCR waardoor sommige soorten beter vermeerderd worden dan anderen door het hechten van de primers (hiervoor kan gecorrigeerd worden).

Verscherpen bioinformatische filters

Uit onderhavige studie is naar voren gekomen dat de eDNA methode zo gevoelig is dat ook DNA van door mensen geconsumeerde vissen of DNA van aasvissen incidenteel gedetecteerd wordt (zie paragraaf 4.1.3). Aan het eDNA zelf is niet te zien van wat voor bron het afkomstig is. Wel kunnen voor dergelijke soorten de filters scherper worden afgesteld. In de regel werd er bij deze detecties zeer weinig eDNA aangetroffen. Er kan dan voor worden gekozen om deze soorten enkel mee te nemen bij een hogere drempelwaarde waardoor de aanwezigheid van de soort in het water betrouwbaarder is. Ook kan nader onderzocht worden of in stromende wateren hogere drempelwaarden gehanteerd dienen te worden om zo eDNA detecties van soorten stroomopwaarts van het traject te verminderen. Voor beiden geldt dat er gezocht moet worden naar een optimale afstemming waarbij niet te veel concessies worden gedaan aan de detectie van zeldzame soorten die in lage dichtheiden voorkomen. Het verdient de aanbeveling om soorten die onder de vastgestelde drempelwaardes blijven wel te vermelden in de resultaten maar met de bijbehorende nuancerings.

Uitbreiden referentiedatabase

Voor deze studie is gebruik gemaakt van een eigen referentiedatabase aangevuld met publieke databases zoals Genbank. Van sommige soorten zijn geen sequenties bekend van het 12S gen waar de primers zich op richten. Dit betekent dat het eDNA van deze soorten wel wordt gedetecteerd in de analyse maar dat de gevonden sequenties niet gematched kunnen worden aan een soort (bijvoorbeeld spiering). Door de referentiedatabase aan te vullen met de nog ontbrekende soorten kunnen deze soorten in de toekomst (en met terugwerkende kracht!) alsnog gematched worden.

Aanpassen en kalibreren KRW-vissenmaatlatten

Als visbemonsteringen op basis van eDNA metabarcoding uitgevoerd gaan worden dan zullen de huidige maatlatten hiervoor aangepast en gekalibreerd moeten worden. Om dit te kunnen doen moet er een database samengesteld worden met eDNA bemonsteringsgegevens van de verschillende watertypen die zich in verschillende toestanden van degradatie bevinden. Op basis van een dergelijke database kan bepaald worden hoe de relatie is tussen de verschillende indicatoren voor soortensamenstelling en abundantie en abiotische waterkwaliteitsfactoren. In de volgende stap kunnen geschikte indicatoren met hun klassengrenzen voor verschillende EKR's opgesteld worden. Voor veel watertypen kunnen de huidige deelmaatlatten en indicatoren waarschijnlijk gehandhaafd blijven. De klassengrenzen zullen moeten worden aangepast aan de eDNA methodiek. Zo kan het zijn dat eDNA een nauwkeuriger beeld geeft van de soortensamenstelling waardoor het maximum aantal soorten binnen een indicator

toeneemt. Een andere mogelijkheid is het maken van nieuwe maatlatten op basis van de sterke punten van de eDNA-metabarcoding methode.

Implementatie bij Nederlandse laboratoria

Voor het implementeren van de eDNA-metabarcoding methode voor de KRW-vismonitoring is het van belang dat er voldoende analysecapaciteit in Nederland beschikbaar komt. Het is daarom van belang om in een vroeg stadium geïnteresseerde labs klaar te stomen voor de analyses. Om tot vergelijkbare en betrouwbare resultaten te komen dient gewerkt te worden in laboratoria die voldoen aan de eisen om contaminatie met eDNA te voorkomen (Willerslev en Cooper, 2005; Herder et al., 2014a).

5.2 Tijdsfad

Gerritsen (2015) geeft aan dat het voor een gevalideerde maatlat vereist is om de eDNA methode minstens 2 jaar toe te passen volgens gestandaardiseerde protocollen. Dit betekent dat, mocht er voor gekozen worden om de huidige bemonsteringsmethodiek te vervangen door eDNA metabarcoding, er ruim van te voren met de voorbereidingen gestart moet worden. Bijvoorbeeld bij implementatie in 2021 zal er al in 2018 gestart moeten worden met een operationele eDNA-vismonitoring naast de gangbare vismethode. Op basis van de meetresultaten kan dan in 2020 de nieuwe maatlat gekalibreerd worden. Bij voorkeur gebeurt dit met/binnen meerdere Europese landen. In België, Frankrijk, Engeland, Noorwegen en mogelijk in meer landen zijn vergelijkbare trajecten gestart om te onderzoeken of eDNA metabarcoding een alternatief kan zijn voor de huidige KRW-visbemonsteringen.

5.3 Verwachte kostenreductie

eDNA metabarcoding kan kosten besparen t.o.v. de huidige KRW-visbemonstering. Een eDNA monster kan door een enkel persoon verzameld worden en kost in de regel minder tijd dan de huidige bemonsteringswijze die vaak met twee of drie personen wordt uitgevoerd. De totale kosten van een eDNA bemonstering bestaan uit de tijd voor het nemen van de monsters en de kosten voor het analyseren van deze monsters. Het grootste deel van de kosten ligt in de Next Generation Sequencing van de monsters. In dit veld volgen de ontwikkelingen elkaar in rap tempo op. Nieuwe apparaten komen met regelmaat op de markt en kunnen grotere hoeveelheden DNA sequenzen tegen lagere monster kosten. De verwachting is dat de kosten van de eDNA analyses daarmee de komende jaren sterk omlaag gaan. Voor een goede vergelijking tussen de kosten met beide methoden is het nodig meer inzicht te krijgen in het aantal eDNA monsters dat nodig is om een compleet beeld te krijgen van een waterlichaam. Gezien de hogere trefkans voor soorten en op het eerste gezicht hoge mate van reproduceerbaarheid (minder bias per monster houdt in dat er met minder monsters volstaan kan worden) is het de verwachting dat er per waterlichaam minder eDNA monsters nodig zijn dan dat er nu trajecten worden bevist in de KRW.

6 Literatuur

- Civade R., T. Dejean, A. Valentini, N. Roset, J Raymond, A. Bonin, P. Taberlet and D. Pont. Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. PLoS ONE, in press.
- Deagle, B.E., Eveson, J.P., Jarman, S.N., 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Front. Zool.* 3, 11.
- De Bruin, A., Spikmans, F., Kranenbarg, J., Herder, J.E., 2014. Soortmanagementplan grote modderkruiper Waterschap Rivierenland fase 1: actualisatie verspreiding 2013. (No. 2013.074). RAVON, Nijmegen.
- De Nie, H., 1996. Atlas van de Nederlandse zoetwatervissen. Media Publishing Int BV, Doetinchem.
- Boyer F, Mercier C, Bonin A et al. (2015) obitools: a unixinspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, doi:10.1111/1755-0998.12428
- Ficetola, G.T., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
- Ficetola GT, Coissac E, Zundel S et al. (2010) An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11, 434.
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguet-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C. M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G. and Taberlet, P., 2015, Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15: 543–556. doi: 10.1111/1755-0998.12338
- Gerritsen, A., 2015. Notitie Pilot eDNA vismonitoring. Rijkswaterstaat.
- Gustavson, M.S., P.C. Collins, J.A. Finarelli, D. Egan, R.O. Conchuir, G.D. Wightman, J.J. King, D.T. Gauthier, K. Whelan, J.E. Carlsson and J. Carlsson, 2015. An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish Biology*, 87 (5): 1254-62.
- Herder, J.E., Valentini, A., Kranenbarg, J., 2012. Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA. *H 2 O* 45, 25.
- Herder, J.E., Kranenbarg, J., De Bruin, A., Valentini, A., 2013b. Op jacht naar DNA Effectief zoeken naar grote modderkruipers. *Visionair* 8–11.
- Herder, J.E., Van Delft, J.J.C.W., Bellemain, E., Valentini, A., 2013. Environmental DNA, krachtig gereedschap voor het monitoren van fauna. *Levende Nat.* jaargang 114, 108–113.
- Herder, J.E., A. Valentini, E. Bellemain, T. Dejean, J.J.C.W. Van Delft, P.F. Thomsen en P. Taberlet, 2014a. Environmental DNA - toepassingsmogelijkheden voor het opsporen van (invasieve) soorten. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-104.
- Herder, J.E., M. Schiphouwer & J. Kranenbarg, 2014b. Pilot vergelijking visbemonsteringen volgens KRW-methode met uitkomsten environmental DNA metabarcoding voor R en M typen. Stichting RAVON, Nijmegen. Rapport 2013-078
- Herder, J.E., K. van Bochove & J. Kranenbarg 2016. Genetisch onderzoek kleine modderkruipers Nederland – Voorkomen *Cobitis taenia* en hybriden. Rapportnummer 2015-103, Stichting RAVON.
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2011. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* 4, 150–157.

- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB , 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. PLoS ONE, 9, e86175.
- Klymus, K.E., Richter, C.A., Chapman, D.C., Paukert, C., 2015. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. Biol. Conserv. 183, 77–84.
- Melis, J. en M. Koopmans, 2015. Fiskatlas Fryslân, verspreiding en ecologie van zoetwatervissen in Fryslân. Bronmeer, Gorredijk.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R.M., Gough, K. C. 2014. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. Journal of Applied Ecology, 51: 1450–1459. doi: 10.1111/1365-2664.12306
- STOWA, 2010. Handboek hydrobiologie.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H., 2012. Environmental DNA. Molecular Ecology. 21, 1789–1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z., 2012. Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. PloS One 7, e35868.
- Takahara T, Minamoto T, Doi H, 2013. Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. PLoS ONE 8(2): e56584.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012a. Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. PLoS ONE 7, e41732. doi:10.1371/journal.pone.0041732
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Mol. Ecol.
- Trautner J., 2006. Rapid identification of European (*Anguilla anguilla*) and North American eel (*Anguilla rostrata*) by polymerase chain reaction. Inf. Fischereiforsch. 53, 2006, 49–51. Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg
- Turner, C.R., Barnes, M.A., Xu, C.C.Y., Jones, S.E., Jerde, C.L., Lodge, D.M., 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. bioRxiv. doi:10.1101/001941
- 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
- Willerslev, E., Cooper, A., 2005. Ancient DNA. Proc. R. Soc. B-Biol. Sci. 272, 3–16.

Bijlage 1 - tabellen

Table a: geeft een overzicht van de bemonsterde locaties per waterschap. Gegeven zijn de waternaam, het KRW-type van het waterlichaam waarin het water ligt, de tijdens de KRW ingezette methoden (E = electrovissen; Z = zegen; F = fuik, L = Leusnet; SK = Stortkuil), de eDNA monstermethode, de coördinaten en tot slot de unieke eDNA monster code.

Waterschap	Water / traject	KRW-type	KRW-vangtuig	eDNA-methode	X-coördinaat	Y-coördinaat	Monster code
Brabantse Delta	Beneden Donge - Keizersveer	R6	E + Z	Pomp	121785	412909	WF150536
Brabantse Delta	Beneden Donge - Nion	R6	E	Pomp	119559	410493	WF150543
Brabantse Delta	Boven Donge - Leijkant	R4	E	Pomp	129736	394414	WF150548
Brabantse Delta	Boven Donge - Reeshof	R4	E + Z	Zak	126768	400511	WF150549
Brabantse Delta	Boven Donge - Oude Leij Riel	R4	E	Zak	130054	392959	WF150550
Brabantse Delta	Gat van den Ham	M14	E + Z	Pomp	110357	414695	WF150552
de Dommel	Afwateringskanaal Eindhoven	M3	E + 2Z	Pomp	159056	381213	WF150588
de Dommel	Esche Stroom a	R6	E + Z	Pomp	150314	406700	WF150584
de Dommel	Esche Stroom - Nemer	R6	E	Pomp	144144	399925	WF150586
de Dommel	Esche Stroom b	R6	E + Z	Pomp	150314	406700	WF150589
de Dommel	Midden en beneden Dommel	R6	E	Pomp	152362	405040	WF150587
Delfland	Oostboezem - Singels den Haag	M7b	2E + 2Z	Zak	80419	455009	WF150571
Delfland	Oostboezem - Korte Laak	M7b	E + Z	Zak	79984	451548	WF150572
Delfland	Oostboezem - Polderwetering	M7b	E	Zak	86904	439444	WF150573
Delfland	Oostboezem - Berkelsche Zweth	M7b	E + 2Z	Pomp	88330	443042	WF150874
Delfland	Polder Berkel 1	M3	E + Z	Zak	91006	443383	WF150575
Delfland	Polder Berkel 2	M3	E + Z	Zak	92644	445732	WF150576
HDSR	Bijleveld	M3	E	Zak	129730	454050	WF150539
HDSR	Leidsche Rijn	M6b	E + Z	Zak	133272	454947	WF150537
HDSR	Ouwenaar Haarrijn	M3	E + Z	Zak	128944	460991	WF150542
HDSR	Schermerhornpark Nieuwegein	ROUL	E + 2Z	Zak	134141	451598	WF150538
HDSR	Bijleveld - RM	ROUL	E + Z	Zak	127355	458403	WF150540
HDSR	Vasco da Gamalaan	ROUL	E + Z	Zak	135039	453340	WF150547
HHNK	Oosterdel 1	M14	E + 2Z	Pomp	115888	521358	WF150568
HHNK	Oosterdel 2	M14	E + 2Z	Zak	116107	522102	WF150569
HHNK	Oosterdel 3	M14	E	Pomp	116970	522123	WF150570
HHNK	Twiske - Stooterplas 1	M14	E + Z	Pomp	121371	495518	WF150096
HHNK	Twiske - Stooterplas 2	M14	E	Pomp	121724	496287	WF150098
HHNK	Twiske - Zijwater Stooterplas	M14	E + 2Z	Zak	120279	496942	WF150879

HHSK	Bergse Voorplas	M27	E	Pomp	93863	440445	WF150578
HHSK	Kralingse Plas	M14	E	Pomp	95440	438566	WF150577
HHSK	Ringvaart Gouda	M10	E	Zak	105772	447226	WF150546
HHSK	Sloten waterrijk Berkenwoude	M8	E + Z	Zak	108320	439111	WF150544
HHSK	Sloten waterrijk EGB	M8	E + Z	Zak	102592	440313	WF150545
HHSK	Vaart Bleiswijk	M10	E	Zak	97342	450953	WF150541
Rijn en IJssel	Aa strang	R6	E	Pomp	229779	430025	WF150590
Rijn en IJssel	Berkel grens Rekken	R6	E	Pomp	248625	457055	WF150583
Rijn en IJssel	Berkel Zutphen	R6	E	Pomp	215461	462852	WF150878
Rijnland	Polder Stein	M8	E	Zak	111266	447961	WF150564
Rijnland	Zegerplas	M20	E	Pomp	106800	461742	WF150565
Rijnland	Zegerplas - Kromme Aar West	M20	E + 2Z	Pomp	106051	460580	WF150566
Rijnland	Zegerplas - Kromme Aar Oost	M20	E + 2Z	Pomp	107703	461927	WF150567
Rijnland	Zoetermeerse plas 1	M20	E	Pomp	94267	455811	WF150562
Rijnland	Zoetermeerse plas 2	M20	Z	Pomp	94900	455626	WF150563
Schelde Stomen	Borssele 2	M30	L	Zak	044131	384257	WF150553
Schelde Stomen	Borssele 3	M30	Z	Zak	040466	381790	WF150558
Schelde Stomen	Borssele 1	M30	L	Zak	042175	384878	WF150559
Schelde Stomen	Eendracht	M30	Z + L + F	Zak	73724	393644	WF150560
Schelde Stomen	Glerum	M31	Z + F	Zak	062227	384222	WF150557
Schelde Stomen	Stavenisse	M31	Z + F	Zak	61857	398629	WF150561
Waternet	Grote Maarsseveense plas	M20	E + Z	Pomp	134529	461678	WF150574
Waternet	Noorder IJplas a	M30	Z	Pomp	119285	492267	WF150533
Waternet	Noorder IJplas b	M30	Z	Pomp	119285	492267	WF150534
Waternet	Noorder IJplas c	M30	Z	Pomp	119285	492267	WF150535
Waternet	OBT - Dwarsdijk	M27	E	Zak	134839	464643	WF150880
Waternet	Westbroekse Zodden	M27	E + Z	Zak	136828	464022	WF150579
Waterskip Fryslan	De Deelen a	M27	E + 3Z	Zak	190851	559724	WF150554
Waterskip Fryslan	De Deelen b	M27	E + 3Z	Zak	190851	559724	WF150555
Waterskip Fryslan	De Deelen c	M27	E + 3Z	Zak	190851	559724	WF150556
Waterskip Fryslan	Nannewijd a	M14	SK	Pomp	187397	551709	WF150580
Waterskip Fryslan	Nannewijd b	M14	SK	Pomp	187397	551709	WF150581
Waterskip Fryslan	Nannewijd c	M14	SK	Pomp	187397	551709	WF150582

Tabel b: geeft een overzicht van het totaal aantal gedetecteerde soorten per locatie (eDNA + KRW samen) en van het aantal gedetecteerde soorten met eDNA-metabarcoding en in de KRW-visbemonstering afzonderlijk.

Waterschap	Water/traject	Soorten eDNA + KRW	Soorten eDNA	Soorten KRW
Brabantse Delta	Beneden Donge - Keizersveer	18	18	9
Brabantse Delta	Beneden Donge - Nion	17	16	10
Brabantse Delta	Boven Donge - Leijkant	9	8	6
Brabantse Delta	Boven Donge - Oude Leij Riel	6	6	5
Brabantse Delta	Boven Donge - Reeshof	15	13	13
Brabantse Delta	Gat van den Ham	21	19	18
de Dommel	Afwateringskanaal Eindhoven	22	22	6
de Dommel	Essche Stroom a	25	25	12
de Dommel	Essche Stroom b	23	22	12
de Dommel	Essche Stroom - Nemer	20	20	10
de Dommel	Midden en beneden Dommel	27	27	12
Delfland	Oostboezem - Berkelsche Zweth	19	14	15
Delfland	Oostboezem - Korte Laak	12	8	7
Delfland	Oostboezem - Polderwetering	15	15	6
Delfland	Oostboezem - Singels den Haag	8	8	5
Delfland	Polder Berkel 1	12	11	9
Delfland	Polder Berkel 2	12	11	10
HDSR	Bijleveld	14	14	9
HDSR	Bijleveld - RM	17	16	13
HDSR	Leidsche Rijn	14	13	9
HDSR	Ouwenaar Haarrijn	16	15	14
HDSR	Schermerhornpark Nieuwegein	16	15	12
HDSR	Vasco da Gamalaan	14	14	10
HHNK	Oosterdel 1	14	14	4
HHNK	Oosterdel 2	13	13	10
HHNK	Oosterdel 3	14	14	13
HHNK	Twiske - Stooterplas 1	15	15	8
HHNK	Twiske - Stooterplas 2	11	10	8
HHNK	Twiske - Zijwater Stooterplas	14	13	9
HHSK	Bergse Voorplas	13	13	7
HHSK	Kralingse Plas	10	9	9
HHSK	Ringvaart Gouda	18	18	5
HHSK	Sloten waterrijk Berkenwoude	13	13	8
HHSK	Sloten waterrijk EGB	16	16	13

HHSK	Vaart Bleiswijk	12	12	6
Rijn en IJssel	Aa strang	22	20	14
Rijn en IJssel	Berkel grens Rekken	20	19	13
Rijn en IJssel	Berkel Zutphen	18	16	13
Rijnland	Polder Stein	12	12	4
Rijnland	Zegerplas	13	12	5
Rijnland	Zegerplas - Kromme Aar Oost	17	17	12
Rijnland	Zegerplas - Kromme Aar West	13	12	4
Rijnland	Zoetermeerse plas 1	9	8	6
Rijnland	Zoetermeerse plas 2	9	4	9
Schelde Stroom	Borssele 1	7	7	6
Schelde Stroom	Borssele 2	9	9	5
Schelde Stroom	Borssele 3	7	7	4
Schelde Stroom	Eendracht	14	14	10
Schelde Stroom	Glerum	6	5	5
Schelde Stroom	Stavenisse	18	18	6
Waternet	Grote Maarsseveense plas	12	11	8
Waternet	Noorder IJplas a	14	13	13
Waternet	Noorder IJplas b	18	17	13
Waternet	Noorder IJplas c	19	18	13
Waternet	OBT - Dwarsdijk	8	8	5
Waternet	Westbroekse Zodden	5	5	4
Waterskip Fryslan	De Deelen a	10	8	9
Waterskip Fryslan	De Deelen b	11	9	9
Waterskip Fryslan	De Deelen c	11	9	9
Waterskip Fryslan	Nannewijd a	9	8	6
Waterskip Fryslan	Nannewijd b	9	8	6
Waterskip Fryslan	Nannewijd c	11	11	6

Tabel c: geeft een overzicht van soorten die op een traject gemist zijn met eDNA terwijl ze wel gevangen zijn in de KRW-visbemonstering. Gegeven zijn de soort (kan meerdere keren voorkomen als de soort op meerdere trajecten gemist is met eDNA) en het aantal individuen van een soort en de biomassa die gevangen is in de KRW-vistandbemonstering op hetzelfde traject.

Soort	Aantal individuen gemist met eDNA	Biomassa gemist met eDNA
Alver	10	24,8
Alver	19	55,7
Alver	14	311,1
Berpmpje	1	1,6
Bittervoorn	4	21,6
Blankvoorn	1	1,8
Brakwatergrondel of Dikkopje	7	3,4
Driedoornige stekelbaars	2	0,5
Driedoornige stekelbaars	2	0,6
Driedoornige stekelbaars	5	2,3
Europese meerval	2	
Karper	1	5316,3
Kleine modderkruiper	1	3
Kleine modderkruiper	3	7,1
Kleine modderkruiper	5	18,9
Kolblei	2	4,5
Kolblei	1	176,2
Kolblei	18	282,4
Kroeskarper of Giebel	2	15,8
Kroeskarper of Giebel	3	52,9
Kroeskarper of Giebel	2	3108
Paling	1	124,2
Paling	1	501,4
Paling	2	907,8
Paling	2	1018,7
Paling	2	2243,7
Pos*	35	290,4
Rivier- of Beekdonderpad	1	2,8
Riviergrondel	3	4,2
Riviergrondel	1	12
Roofblei	1	10,4
Ruisvoorn	1	19
Ruisvoorn	3	413,7
Snoek	1	1277,8

Snoekbaars	2	71,6
Snoekbaars*	19	2352,1
Spiering**	1	1,9
Tiendornige stekelbaars	1	0,6
Vetje	6	1,9
Vetje	7	3,7
Winde of Serpeling	6	49,4
Zeelt	1	0,1
Zeelt	7	314,8

**) betref monster Zoetermeerse plas*

****) gemist met eDNA maar komt waarschijnlijk door ontbreken in referentiedatabase*

Tabel d: geeft een overzicht van soorten die op een traject gemist zijn met de KRW-visbemonstering maar wel met eDNA zijn gedetecteerd. Gegeven is het aantal trajecten waarop een soort gemist is met de KRW en het gemiddeld aantal DNA-sequenties dat gedetecteerd is op trajecten waar de soort gemist is.

Soort	Aantal keer gemist	Gemiddeld aantal sequenties gemist
Alver	9	2865
Amerikaanse Hondsvij	3	1183
Atlantisch zalm	3	1262
Beek- of Rivierprik	1	1146
Beek- of Zeeforel	1	1727
Bermpje	5	8171
Bittervoorn	16	19506
Blankvoorn	1	4791
Blauwband	1	251
Bot	1	1968
Brakwatergrondel of Dikkopje	1	782
Brasem	15	69298
Driedoornige stekelbaars	7	11315
Europese meerval	1	247
Fint of Elft	2	802
Gras- Grootkop- of Zilverkarper	8	1032
Karper	27	5336
Kesslers grondel	1	478
Kleine modderkruiper	16	17667
Kolblei	14	9179
Kopvoorn	5	1035
Kroeskarper of Giebel	8	5402
Marmmergrondel	5	23527
Paling	15	1348
Pos	19	19985
Regenboogforel	3	1488
Rivier- of Beekdonderpad	12	9004
Riviergrondel	3	6716
Roofblei	7	28017
Ruisvoorn	21	28933
Snoek	8	22035
Snoekbaars	17	2166
Sprot	3	3805
Tienddoornige stekelbaars	20	2528
Vetje	17	10484
Winde of Serpeling	6	1196
Zeelt	17	13141
Zonnebaars	4	4711
Zwartbekgrondel	4	39460

Bijlage 2 - details onverwachte soorten

Hieronder worden de onverwachte met eDNA-metabarcoding aangetroffen soorten genoemd en besproken.

Zwartbekgrondel

Deze soort werd aangetroffen in de Aa Strang op de grens bij Rekken (zeer sterk eDNA signaal: veel sequenties gevonden). Deze soort was nog niet bekend van deze locatie en ook niet gevangen in de KRW. Navraag bij Waterschap Rijn en IJssel leerde dat de soort waarschijnlijk bovenstrooms in Duitsland geïntroduceerd is doordat sportvissers zwartbekgrondel gebruiken als aasvis.

Bittervoorn en kleine modderkruiper

Zowel bittervoorn als kleine modderkruiper werden aangetroffen bij Stavenisse terwijl hun voorkomen nog niet bekend was op Tholen. Navraag bij Waterschap Schelde Stromen leerde dat sinds ongeveer 10 jaar zoet water wordt ingelaten op Tholen vanuit het Schelde-Kanaal waardoor het gebied verzoet. Het is de verwachting dat beide soorten hierbij meegekomen zijn.

Kopvoorn

De kopvoorn is met eDNA aangetroffen in het Nanneveld. In slechts één van de drie op hetzelfde traject verzamelde eDNA monsters werd een zeer kleine hoeveelheid (411 sequenties) eDNA van de soort aangetroffen. Dit duidt erop dat de soort hier zeer zeldzaam is. Kopvoorn behoort niet tot de te verwachten visfauna van meren zoals het Nanneveld, de soort leeft van nature in snellerstromende beken en rivieren. De soort werd ook niet in de KRW-bemonsteringen van het Nanneveld aangetroffen. Het voorkomen in Friesland wordt als twijfelachtig beschouwd en waarnemingen uit het verleden (de Nie, 1996) worden toegeschreven aan verwarring met de winde die in de volksmond vaak dezelfde naam heeft als kopvoorn (Melis en Koopmans, 2015). Het aantreffen van de soort met eDNA zou verklaard kunnen worden door het voorkomen van lage dichtheden als gevolg van uitzettingen door de sportvisserij van witvis waarbij al dan niet bewust kopvoorn is meekomen. Een andere mogelijkheid kan intrek vanuit het IJsselmeer zijn waar de soort incidenteel wordt aangetroffen.

Atlantische Zalm

Deze soort is tegen de verwachting in aangetroffen in het Schermhornpark in Nieuwegein. Dit betrof een stadswater onder een groot appartementengebouw met geen geschikt habitat en weinig connectiviteit t.o.v. de grote rivieren. Het is aannemelijk dat het hier om resten van menselijke consumptie gaat. De Atlantische Zalm is daarnaast aangetroffen in de Noorder IJplas (wat goed mogelijk is door de verbinding met het Noordzeekanaal) en de Dommel die ook te bereiken is vanuit zee.

Regenboogforel

De regenboogforel is aangetroffen in een stadswater aan de Vasco da Gamalaan in Utrecht waar op het oog geen geschikt habitat aanwezig is. Menselijke consumptie ligt

hier meer voor de hand. Daarnaast is de regenboogforel aangetroffen in de Aa Strang en Essche Stroom, locaties waar de soort kan voorkomen als gevolg van uitzettingen.

Europese sardine

Deze soort is aangetroffen in de Zegerplas. Gebruik als aasvis ligt hier voor de hand. Daarnaast is Europese Sardine aangetroffen in een vaart net binnendijks bij het gemaal van Borssele, hier zijn net buitendijks veel waarnemingen van de soort in de NDFF. De eDNA concentratie was op de ze locatie ook relatief hoog. Het is niet uit te sluiten dat de soort hier in het zoete water terecht is gekomen. Navraag bij het waterschap Scheldestromen leerde dat er vaker mariene soorten binnendijks worden aangetroffen.

Makreel

Makreel is net als Europese sardine ook binnendijks aangetroffen bij Borssele. Resten van menselijke consumptie of gebruik als aasvis is aannemelijk.

Horsmakreel

Horsmakreel (soort onbepaald) is aangetroffen in het Twiske. Horsmakrelen worden verkocht en gebruikt als aasvis voor het vissen op snoekbaars. Er wordt veel op snoekbaars gevist in het Twiske dus het zeer aannemelijk dat dat de mogelijk bron is.

Oreochromis (Cichliden)

eDNA uit het geslacht *Oreochromis* (Cichliden) is aangetroffen in de stadsgracht van Den Haag. Door een onvolledige referentiedatabase is het DNA niet tot op soort te brengen. Tot dit geslacht behoort onder andere de Tilapia (een veel gegeten vis) maar ook enkele soorten die in aquaria gehouden worden. De aangetroffen hoeveelheid eDNA was relatief hoog (15015 sequenties). Dit is een stuk hoger dan bij overige waarschijnlijk geconsumeerde vissen, mogelijk zijn er cichliden uitgezet door mensen die ze niet langer in hun aquaria wilden.

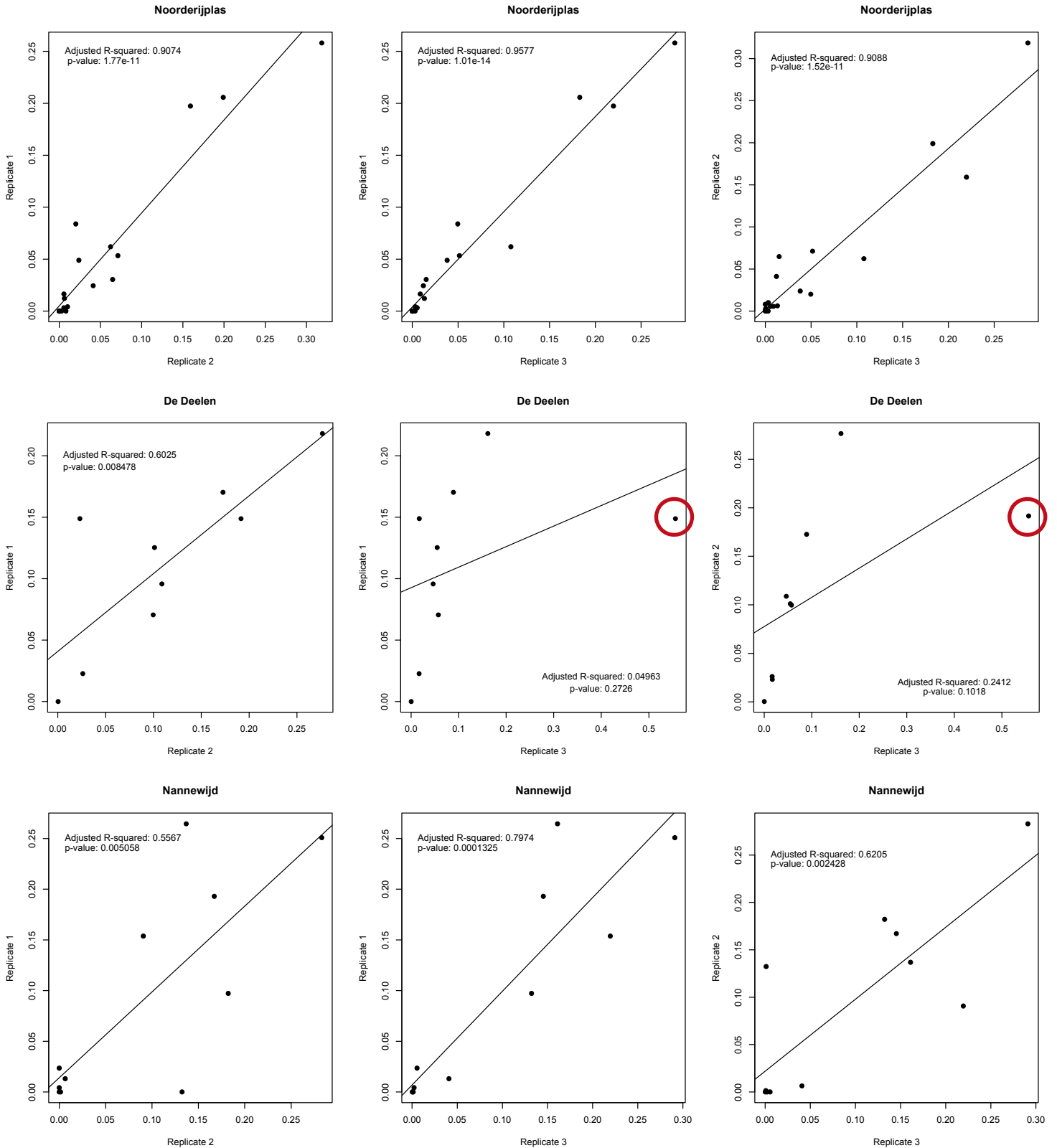
Amerikaanse paling

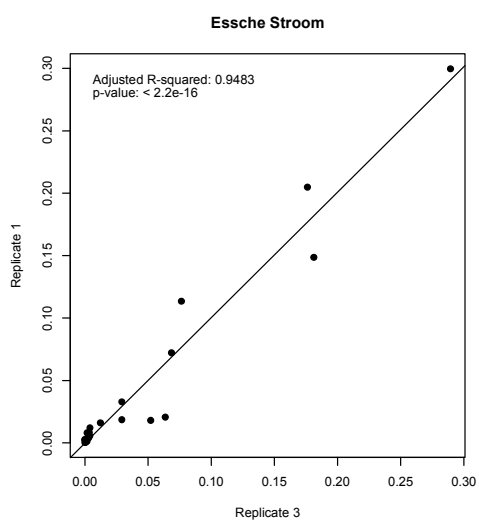
Amerikaanse paling (*Anguilla rostrata*) is aangetroffen in Zeeland bij Eendracht. Deze soort wordt verhandeld voor de consumptie en gebruikt in de palingkwekerijen in Europa, met name door de veel lagere prijs per kilo glasaal veel lager is dan die van de Europese paling (Trautner, 2006). Doordat beide soorten lastig uit elkaar te halen zijn is het eveneens mogelijk dat soort uitgezet wordt in het kader van aalherstel en/of ten behoeve van de beroepsvisserij. De hoeveelheid aangetroffen eDNA was echter erg laag (117 sequenties) wat overeenkomt met andere waarschijnlijk geconsumeerde soorten. Bij de aanwezigheid van levende exemplaren worden doorgaans hogere hoeveelheden eDNA aangetroffen, het is echter niet uit te sluiten dat de soort zeldzaam voorkomt.



Bijlage 3 - statistiek reproduceerbaarheid monstername

Lineaire regressie tussen het aandeel eDNA sequenties per soort (samples zijn één op één vergeleken). Bij de Deelen zorgt 1 outlier voor een slechte correlatie (rood omcirkeld)





RAVON

Reptielen **A**mfibiëën **V**issen **O**nderzoek **N**ederland

Natuurplaza
Toernooiveld 1 - 6525 ED Nijmegen
Postbus 1413 - 6501 BK Nijmegen

T: 024 - 7 410 600 (alg.)
www.ravon.nl

